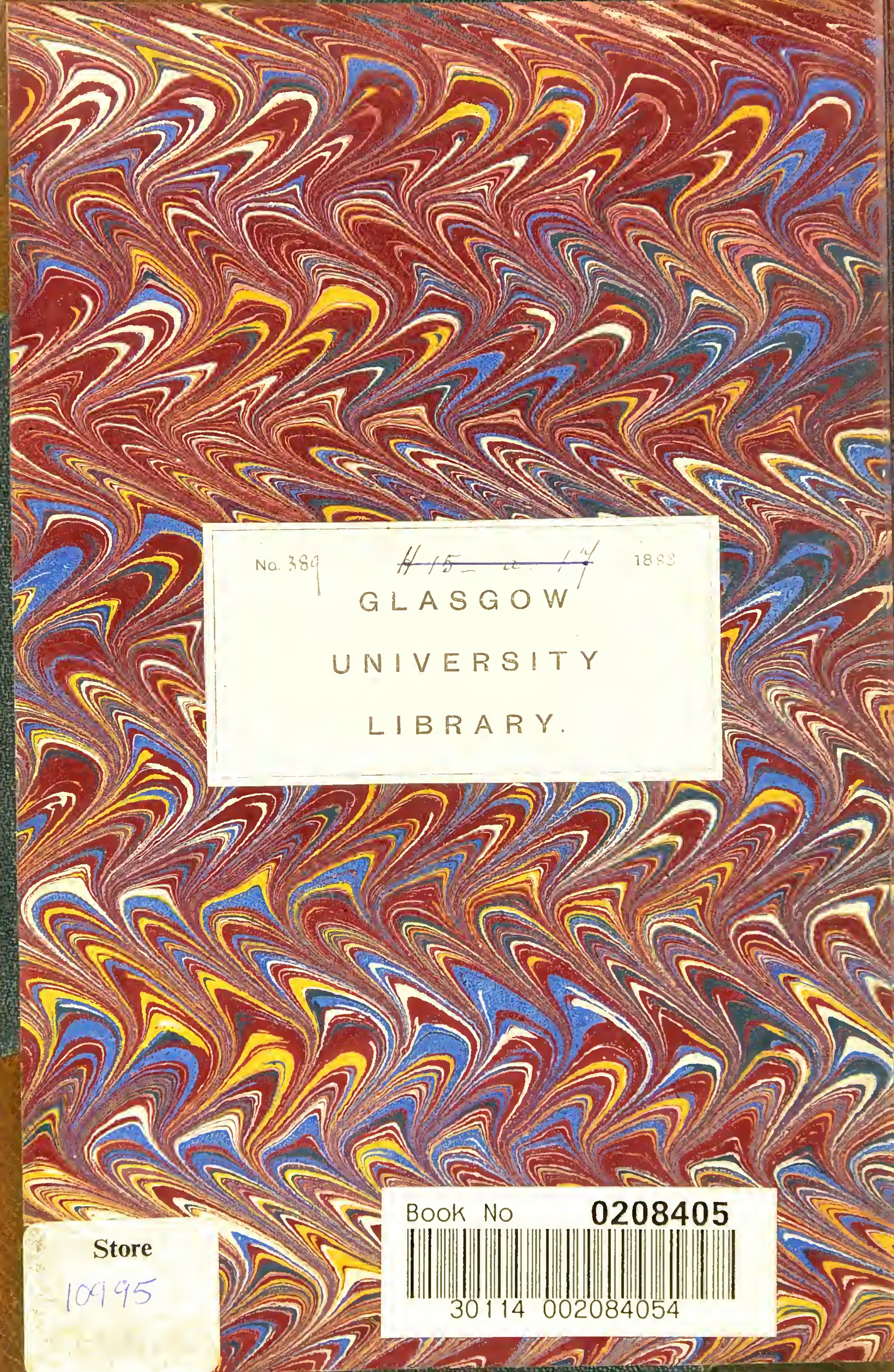
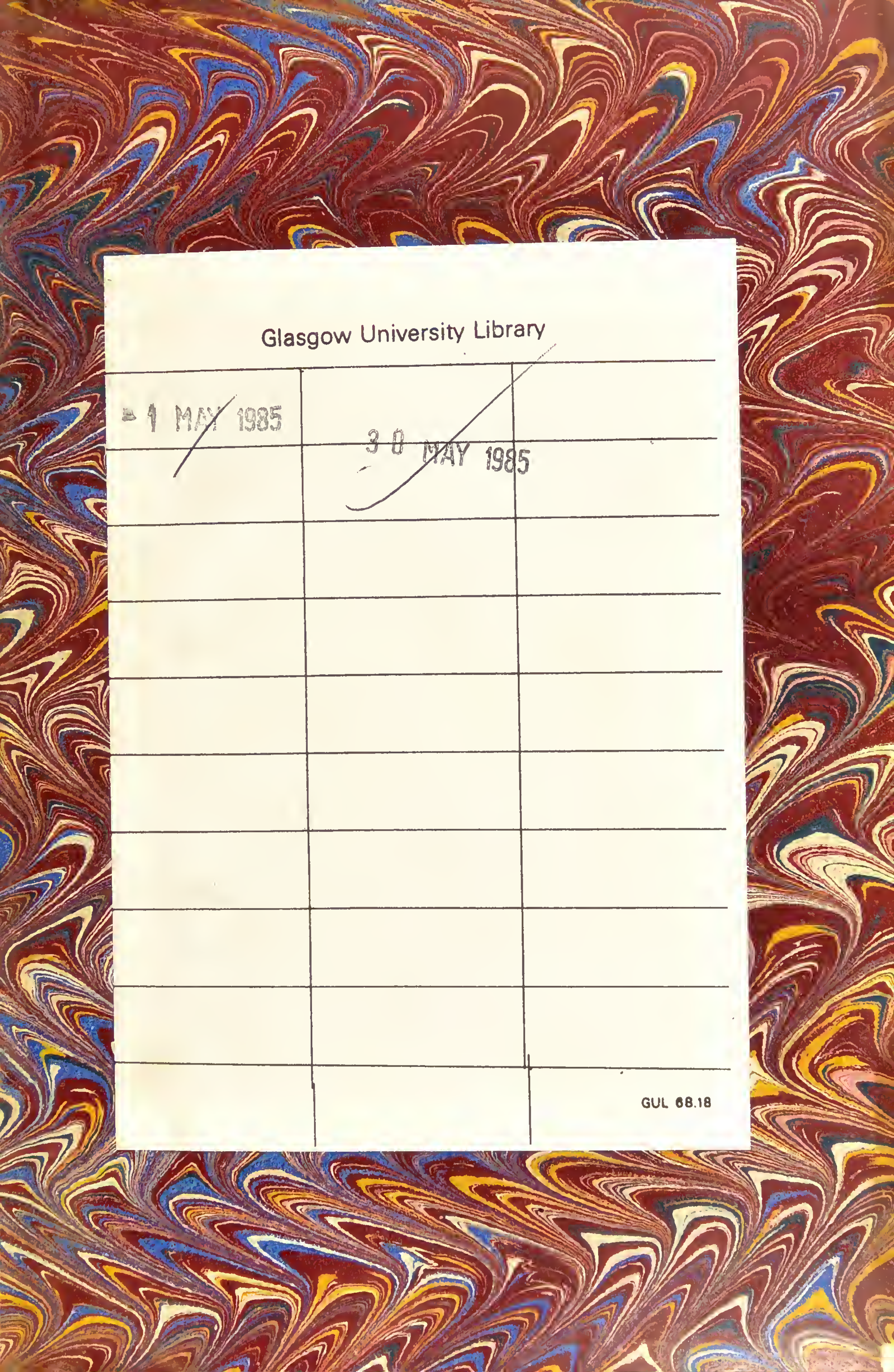




No. 389
H 15 - a. 17
1898
GLASGOW
UNIVERSITY
LIBRARY.
Book No 0208405
30114 002084054
Store
10995



Bruxelles. — Impr. J. LEBÈGUE et Cie, rue Terarken, 6.

MANUEL

DE

TECHNIQUE

MICROSCOPIQUE

APPLICABLE

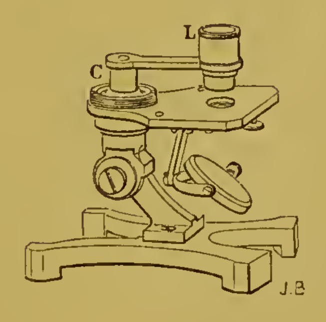
A

L'HISTOLOGIE, L'ANATOMIE COMPARÉE L'EMBRYOLOGIE ET LA BOTANIQUE

PAR

Le Dr P. FRANCOTTE

PROFESSEUR A L'ATHÉNÉE ROYAL DE BRUXELLES



PARIS

J. LEBÈGUE & Cie, ÉDITEURS

25, RUE DE LILLE, 25

ERRATUM

Page 19, figure 5. — La flèche AB doit être dirigée dans le même sens que *ab;* cependant, rien n'est à changer dans la position des lettres.



AVANT-PROPOS.

Dans ces dernières années les méthodes de fixation de coloration et d'inclusion ont atteint un haut degré de perfection. Des procédés permettent maintenant de ranger en séries régulières et continues toutes les sections que l'on peut obtenir en coupant un être organisé en minces tranches. Pour arriver à ce dernier résultat, des instruments perfectionnés, des microtomes d'une grande précision ont été inventés. Enfin, la théorie microscopique, elle-même, a subi une véritable révolution depuis l'emploi des objectifs homogènes et des condenseurs. On peut dire, en toute vérité, qu'il n'existe actuellement en langue française aucun traité qui s'occupe de ces grandes découvertes de la technique moderne et pouvant servir de guide pratique spécialement pour l'étude de l'anatomie comparée et de l'embryologie.

C'est le sentiment des difficultés qui en résultent, qui nous a décidé à entreprendre la publication de ce manuel exclusivement technique.

Nous avons cherché surtout à rédiger un guide précis

qui permette même au travailleur isolé, ne disposant que de ressources limitées, d'aborder avec fruit l'étude pratique des sciences naturelles. Peut-être aussi, en réunissant des données éparses, que la tradition seule enseignait, ce livre pourra-t-il rendre des services et faciliter les recherches dans les laboratoires? Là, sans doute, dans ces centres scientifiques, les études sont plus faciles : le travailleur y peut profiter à la fois d'une installation plus complète et des conseils éclairés d'un maître, avantages dont nous avons apprécié tout le prix lors de nos études à l'Université de Liège. Mais parmi ceux qu'attire l'étude de la nature, combien ne peuvent jouir régulièrement de ces avantages. A ceux-là nous avons essayé de fournir les moyens de s'initier à l'observation personnelle.

Notre manuel est divisé en *trois parties*.

La première partie comprend, outre quelques notions générales sur les dissections et les moyens de se procurer les matériaux d'étude, la théorie optique du microscope résumée suivant les idées modernes. Ce que nous y avons dit constitue un minimum que l'on ne peut ignorer sans s'exposer à de graves erreurs dans l'interprétation des images microscopiques.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes occupé des réactifs et des méthodes de recherches employées en micrographie. Nous nous sommes efforcé de représenter en récapitulant, sous forme de tableaux, la marche des différentes manipulations à exécuter pour arriver à des préparations convenables. Ces clés analytiques, employées par les personnes qui ont travaillé sous notre direction, ont toujours donné d'heureux résultats.

Dans la troisième partie, nous avons renseigné un nombre suffisant d'exercices pour que le débutant puisse lire les traités généraux d'histologie, d'anatomie comparée et d'embryologie, en préparant tout ce qui est nécessaire pour étudier d'une façon rationnelle, par l'observation directe, la structure et la texture des êtres organisés.

Tous ces exercices ont été exécutés par nous et ont été répétés par plusieurs de nos élèves. Il en est de même des réactifs que nous avons fait connaître dans la seconde partie. Toutes les formules que l'on y trouvera ont été soumises à une épreuve rigoureuse et nous n'avons renseigné que celles qui nous ont donné de bons résultats.

Nous adressons nos plus vifs remercîments à M. Crépin, le savant directeur du Jardin Botanique de Bruxelles, qui a bien voulu revoir les épreuves de ce livre et qui a mis généreusement à notre disposition la bibliothèque si complète de l'établissement qu'il dirige.

Dr P. F.

PREMIÈRE PARTIE.

I

DISSECTIONS.

Avant d'aborder l'étude microscopique d'un animal ou même d'un organe quelconque, il est nécessaire, quand la chose est possible, de procéder à un examen approfondi de tout ce qui peut se voir à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe; l'*examen des formes extérieures précédera toujours l'étude de la structure interne*. Pour parvenir à connaître celle-ci, il est indispensable d'isoler les différentes parties de l'organisme, afin de bien saisir les rapports qu'ont entre elles ces dernières. On arrivera à ce but par la dissection. Cette opération nécessite l'emploi d'instruments que nous allons passer en revue :

Baquets a disséquer (fig. 1). — La plupart des invertébrés et même les petits vertébrés se dissèquent sous l'eau ou dans un réactif approprié, parce que dans un liquide les organes délicats flottent sans s'altérer, sans s'affaisser les

uns sur les autres. Pour servir à cet usage, on fera construire un petit baquet (fig. 1) en zinc, de 25 centimètres de

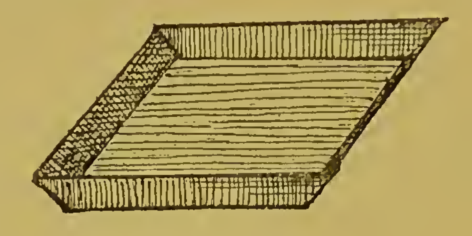


Fig. 1.

long, 15 à 17 de large, 5 de haut; les bords doivent être un peu obliques. Dans le fond seront soudés deux ou trois crochets de 4 à 5 millimètres de haut. On y coulera de la cire d'abeille mélangée d'un peu de noir de fumée. La couche de cire de 1 centimètre d'épaisseur sera retenue par les crochets.

Scalpels. — Quelques scalpels suffisent; on les choisira de diverses formes : un droit, un demi-convexe, un convexe. Il est bon d'en avoir quelques petits.

Ciseaux. — L'acquisition de deux paires de ciseaux est indispensable : l'une plus forte à extrémités mousses; l'autre plus faible à extrémités effilées.

Porte-aiguille. — On trouvera chez les marchands d'instruments de chirurgie divers modèles de porte-aiguille. Comme ils sont toujours un peu chers, on pourra les fabriquer soi-même. Dans le creux de l'armature métallique d'un porte-plume, on coulera de la cire à cacheter; avant qu'elle soit refroidie, on y enfoncera, en la maintenant dans l'axe, une aiguille à coudre très fine. Les aiguilles ordinaires peuvent être employées; on les repassera pour bien les affiler sur une pierre à aiguiser.

Pinces. — Sont également nécessaires deux paires de pinces : l'une plus grande à extrémités émoussées ; l'autre à pointes ténues.

Scie. — Une scie rendra souvent des services. On emploiera avec autant de succès l'instrument avec lequel on fabrique les ouvrages en bois découpés que n'importe laquelle des scies employées en anatomie et qui sont coûteuses.

On tiendra les scalpels et les pinces comme la plume à écrire. Les pinces servent à écarter les parties qui doivent être respectées et aussi à enlever celles qui doivent disparaître.

Les instruments seront parfaitement nettoyés après chaque opération ; le sang coagulé sera enlevé avec soin. Les ciseaux et les pinces nécessitent, sous ce rapport, une attention spéciale : les ciseaux se rouillent plus facilement près de l'axe ; on veillera donc à ce que cette partie soit toujours bien propre ; il s'y dépose des matières étrangères qui mettraient bientôt l'instrument hors d'usage.

Pour repasser les scalpels, on emploiera une pierre à rasoir convenable ; la lame y sera tenue à plat, le tranchant en avant.

Quand on disséquera de petits animaux en vue de faire l'étude histologique de l'un ou l'autre de leurs organes, le baquet à disséquer sera rempli du liquide qui doit fixer les tissus. Les réactifs dont on fait alors usage attaquent pour la plupart l'acier ; il faudra donc non seulement essuyer les instruments à sec, mais il sera nécessaire de les laver à l'eau.

Les dissections qui, à notre avis, doivent devenir classiques sont celles des animaux suivants ; on fera bien de les répéter jusqu'à ce qu'on obtienne des préparations convenables.

1° L'ascaris du cheval ;

2° Le verre de terre ou lombric ;

3° La sangsue ;

4° La moule, l'huître, l'anodonte ;

5° La limace et l'escargot ;

6° Une étoile de mer, ou un oursin ;

7° L'écrevisse, le homard et le crabe ;

8° La chenille, le hanneton, le carabe doré, l'hydrophile, le dytique, la larve de ces deux derniers, la courtilière ;

9° La grenouille, le lézard ;

10° Un oiseau ; par exemple, le pigeon ;

11° La souris, le rat, les embryons de moutons que l'on se procure facilement dans les abattoirs.

Bibliographie. — Pour les dissections, on se servira de l'un ou l'autre des ouvrages suivants :

a) Traité de Zoologie, par Claus, traduit par Moquin-Tandon, avec figures.

b) Grundriss der Zoologie für Studirende bearbeitet, von G. V. Kock, avec 20 planches contenant de nombreux dessins.

c) Zoologie. — Schmarda Wien. 1878. Nombreuses figures.

d) Éléments d'anatomie comparée des animaux vertébrés, par Huxley. (Traduction française.)

e) Éléments d'anatomie comparée des animaux invertébrés, par Huxley. (Traduction française.)

f) Le Manuel d'anatomie comparée, par G. Gegenbauer, sera à consulter quand l'étudiant aura acquis une certaine expérience.

g) Zoologie élémentaire par F. Plateau.

h) Cours élémentaire et pratique de biologie, par Huxley.

Sujets d'étude. — On se procure l'ascaris du cheval dans les abattoirs. On plongera un certain nombre de ces vers dans l'alcool si l'on ne peut les préparer immédiatement.

Pour les étudier, on étendra un spécimen convenablement choisi dans le baquet rempli d'eau; on le fixera la face ventrale contre la cire. A l'aide des ciseaux, on fera au dos une boutonnière longitudinale exactement sur la ligne médiane en commençant par la partie inférieure; les deux lèvres de la boutonnière seront éloignées avec les pinces; puis, les écartant assez, on les fixera à l'aide d'épingles. On continuera à ouvrir dans toute la longueur, toujours en attachant les bords par des épingles. L'intestin s'apercevra facilement; des tubes blanchâtres se montreront occupant une grande partie de la cavité viscérale. On cherchera à reconnaître les différents organes en s'aidant d'un traité de zoologie. On dessinera avec soin la préparation. Avec un peu de persévérance, on parviendra rapidement à représenter la préparation que l'on fait.

On tiendra scrupuleusement note de tout ce qui a été vu, des procédés employés pour arriver aux résultats. On aura toujours à se repentir de négliger ce conseil, qui s'applique, d'ailleurs, à toutes les recherches dont il sera question dans cet ouvrage.

On trouvera différentes espèces de sangsues dans tous les ruisseaux des prairies. On les conservera vivantes dans les aquariums que l'on aura soin de recouvrir de mousseline pour les empêcher de s'échapper.

La sangsue, le lombric des jardins et la chenille sont examinés comme l'ascaris.

Après avoir été tués dans l'alcool, ces animaux seront étendus dans le baquet à disséquer, la face ventrale contre la cire; on les ouvrira par le dos, comme il est indiqué plus haut.

L'écrevisse, le crabe, le hanneton, le carabe doré et, en général, tous les arthropodes se dissèquent en ouvrant l'animal par le dos, alors qu'il est appliqué intimement au fond du baquet et maintenu par des épingles.

L'étude de la grenouille par de nombreux exercices zootomiques est d'une importance capitale, surtout si l'on n'a pas l'occasion de faire des dissections de cadavre humain dans un amphithéâtre.

La grenouille est un sujet facile à se procurer; elle se prête on ne peut mieux à nos investigations. Deux ouvrages renferment tous les renseignements désirables pour procéder avec fruit à l'examen de l'animal qui nous occupe; ce sont : *Cours élémentaire de biologie* par Huxley et *la Zoologie élémentaire* par M. Plateau dont il a déjà été question plus haut.

La souris et le rat se prêtent également bien à l'étude. Il en est de même des embryons de brebis et de vache que l'on ira prendre dans les abattoirs. Ces animaux seront encore disséqués sous l'eau, mais on les ouvrira par le ventre quand on voudra connaître les organes renfermés dans la cavité péri-viscérale.

Pour faire l'étude du système nerveux central, on les fixera la face ventrale appliquée sur le fond du baquet.

On pourra aussi avoir recours à la congélation et la section à l'aide d'une scie suivant diverses directions. Les coupes longitudinales perpendiculaires à la face ventrale, longitudi-

nales et parallèles à cette face, ainsi que des coupes transversales sont très instructives; elles permettent, surtout, de fixer les rapports entre les différents organes.

On arrivera à congéler ces animaux en les plaçant dans un mélange parties égales de sel marin et de glace pilée (température — 13°). Le durcissement étant complet, on les sciera suivant la direction désirée comme si on sciait une planche.

La glace faisant défaut, le spécimen sera plongé dans une dissolution aqueuse d'acide chromique à 1/2 p. c. Après quelques jours, on le transportera dans l'alcool qui achèvera le durcissement.

Les coupes seront ensuite étudiées et dessinées avec soin.

Les préparations obtenues par dissections ordinaires ou par sections, comme nous venons de le décrire, peuvent être conservées dans des flacons cylindriques remplis d'alcool et bouchés à l'émeri, mais le procédé est coûteux. On parvient à obtenir de très belles préparations sèches sans trop de dépense; voici comment (1) : le spécimen que l'on désire garder ayant été disséqué ou débité en coupes est placé dans de l'alcool assez longtemps pour que le tout en soit complètement imprégné; ensuite, on le laisse séjourner quelques jours dans la térébenthine, puis on l'enlève de ce liquide et on laisse sécher à l'air. Il se produit ainsi une véritable momie à l'abri de la putréfaction et de la déformation. Cette méthode est très pratique, et surtout recommandable quand on se trouve dans la nécessité de former une collection, alors que l'on ne dispose que d'un modeste budget.

(1) Procédé de M. L. Fredericq, professeur de physiologie à l'Université de Liège.

ANIMAUX ET AQUARIUMS.

La plupart des naturalistes, dans ces derniers temps, ont surtout porté leur attention sur les animaux marins. Mais le chercheur modeste, qui n'a pas l'occasion de faire un séjour au bord de la mer, rencontrera également les sujets d'étude les plus variés dans les ruisseaux des prairies, les mares, les rivières : il y a là bien des choses à découvrir.

En promenant dans ces eaux un petit filet confectionné à l'aide d'une mousseline, on ramènera toute une collection d'infusoires, turbellariés, rotateurs annélides, petits crustacés. Pour recueillir le produit de la pêche, quand il s'agit de ces petits êtres délicats, on n'enlève pas le filet entièrement de l'eau; mais on le soulève jusqu'à ce que son contenu soit réduit à un litre environ; on recueille celui-ci à l'aide d'un vase en verre, dont on transvase le contenu dans des flacons à large goulot.

Pour recueillir de petits organismes aquatiques, G.-F. George a imaginé un filet (fig. 2) dont le fond est rem-

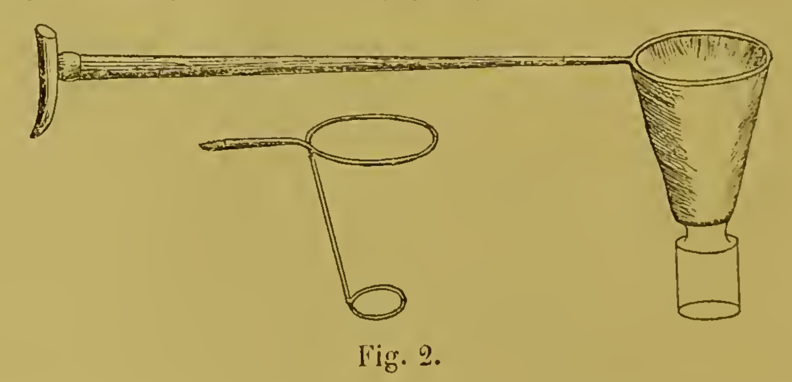


Fig. 2.

placé par une bouteille à large goulot. [Voir *Journal Post. Micr. Soc. i.* (1882), pp. 138-9 (1 fig.).]

On peut facilement confectionner cet appareil. On contourne un fil de fer d'une épaisseur convenable en un cercle ayant 10 à 12 centimètres de diamètre. Le fil est de nouveau plié; à une longueur de 8 à 10 centimètres, on forme encore un cercle, mais n'ayant que 4 centimètres de diamètre. Les deux cercles sont placés parallèlement (voir fig. 2); on coud un morceau de cordon au plus grand, et on y attache au pourtour un sac conique en mousseline qui vient se fixer également au cercle inférieur.

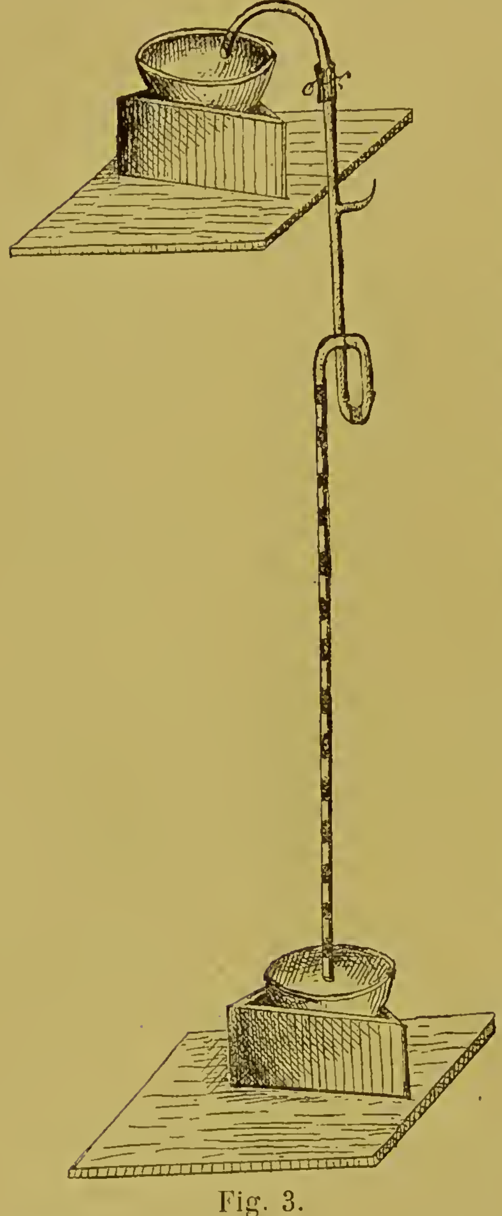
Un flacon de 70 à 100 centimètres cubes de capacité se fixe à ce dernier par le rebord du goulot que l'on attache plus solidement encore, si on le désire, avec un morceau de ficelle ou de fil de fer.

On pêche les animalcules à la surface de l'eau (pêche à la surface) ou dans les herbes flottantes en promenant en tous sens l'appareil que je viens de décrire. Celui-ci doit être fixé à une canne ou un bâton.

Après quelque temps, le filet est retiré de l'eau; le liquide traverse la mousseline, et les petits êtres se retrouvent dans le bocal. Ce dernier est enlevé de son cercle, et son contenu versé dans le flacon destiné à conserver les récoltes.

Un filet en toile doit être employé pour la pêche des animaux plus volumineux, tels que grenouilles, tritons, têtards, larves et vers de toutes espèces. Sous les pierres des ruisseaux et des rivières, on découvre des sangsues, des clepsines, des turbellariés. Attachés aux végétaux flottants, aux tiges aquatiques, on trouve des hydres, des œufs de sangsues et de mollusques. Dans la vase, on aura à chercher des tubifex et autres annélides, ainsi que différentes larves.

Il s'agit maintenant de conserver en vie, à domicile, tous ces organismes qui doivent faire l'objet de nos études et de nos recherches. On aura soin de les placer dans les conditions d'existence semblables à celles où ils se trouvaient avant leur capture.


Fig. 3.

On emploiera à cet effet des aquariums sphériques, pareils à ceux dans lesquels on conserve ordinairement les poissons rouges. Les récipients de formes rectangulaires sont sans doute ceux que l'on préférerait, mais ils sont d'un prix élevé.

L'eau des aquariums doit être souvent changée; mais ce qui peut manquer aux captifs qu'on y entretient, c'est l'oxygène nécessaire à la respiration. Il faut surtout avoir soin de renouveler constamment cet agent, afin que l'eau en soit toujours saturée. Pour cela, on se servira de l'aspirateur décrit ci-après (fig. 3). La confection de celui-ci est simple et peu coûteuse.

A 30 centimètres de l'une des extrémités d'un tube de verre, d'un diamètre de 5 à 7 millimètres et d'un mètre de longueur, on forme un œillet, après avoir chauffé et ramolli une grande surface du tube. C'est le procédé employé pour obtenir l'anneau des tubes de sûreté, employés en chimie et connus de tout le monde.

Le tube se trouve ainsi partagé en deux parties inégales : la moins longue, que nous appellerons, pour faciliter la description, la partie supérieure.

A 7 ou 8 centimètres au-dessus de l'œillet, sur la partie supérieure, on chauffe un point à l'aide d'un dard d'un chalumeau à gaz : l'expérience réussit également bien avec la lampe à alcool et le chalumeau ordinaire.

Le verre chauffé produit en s'affaissant une petite perle. Celle-ci étant bien rouge, à l'aide d'un fragment de tube qu'on y applique, on étire l'amas de verre en un petit tube capillaire qui est recourbé, s'il est possible, à angle droit à 1 centimètre de son origine ; en même temps, on l'ouvre en brisant l'extrémité.

Le tube, ainsi préparé, sera mis en communication avec un réservoir d'une contenance de quelques litres, placé à la hauteur de 1 à 1 1/2 mètre. Il suffit pour cela d'unir, par l'intermédiaire d'un tube en caoutchouc, l'extrémité supérieure de l'appareil, à un siphon dont la courte branche plonge dans le réservoir. En aspirant par l'extrémité inférieure du tube, celui-ci se charge d'eau ; la colonne liquide joue le rôle d'un piston dans le corps d'une pompe et l'air est aspiré par le tube capillaire ; il se produit une suite de petites colonnes d'eau, comprenant entre elles, et les aspirant, de petites bulles d'air.


Fig. 4.

Il est maintenant nécessaire de régler l'arrivée de l'eau, sinon le réservoir serait bientôt vide et l'air n'arriverait d'ailleurs pas en proportion du liquide écoulé. Pour cela, on comprimera, à l'aide d'une pince, le tube en caoutchouc qui unit les deux parties du système; on fera marcher l'appareil aussi lentement que possible de façon qu'on puisse compter facilement les bulles d'air entraînées.

L'extrémité inférieure du tube sera plongée dans l'aquarium. L'air amené y barbotera, produisant également un mouvement dans le liquide.

Dans les Bulletins de la Société de microscopie, t. IX, nº III, M. H. Fol, l'éminent professeur de Genève, a fait connaître comment il parvenait à immobiliser et à préparer les cœlenterés et les échinodermes, en saturant l'eau de mer par l'acide carbonique. Pour arriver à saturer lentement l'eau de mer, on modifiera l'aspirateur décrit ci-dessus. Au lieu d'étirer un tube capillaire sur le tube principal, on y soude, à angle droit, un tube de même diamètre que ce dernier; on recourbe légèrement cette branche; on en met l'extrémité libre en communication, par l'intermédiaire d'un tube en caoutchouc, avec un appareil dégageant

le gaz nécessaire. On peut également, par le même moyen, faire passer de l'air sur du chloroforme, de l'éther ou un autre réactif, et immobiliser les animaux pour les conserver dans leurs formes.

D'autres systèmes d'aspirateurs sont employés dans les laboratoires pour fournir l'air nécessaire aux plantes et aux animaux soumis à l'observation. Ces appareils sont plus compliqués et plus coûteux que celui qui vient d'être décrit.

Pour saisir de très petits animaux, infusoires, crustacés, hydres, etc., on se sert d'une pipette fabriquée à l'aide d'un tube de sûreté, employé en chimie; l'entonnoir, à la partie supérieure, est fermé par une membrane de caoutchouc que l'on maintient à l'aide de quelques tours de fil sur le rebord; l'extrémité inférieure est terminée en pointe comme le montre la figure 4. Quand on veut saisir un objet dans l'eau, on appuie le doigt sur la membrane; l'air étant chassé par l'extrémité ouverte du tube, en retirant le doigt, l'eau s'introduit dans l'appareil entraînant avec elle les objets voisins de l'extrémité.

Au lieu d'entonnoir à l'extrémité du tube, on peut y appliquer simplement un fragment de tube en caoutchouc que l'on ferme à l'une des bouts. En appuyant sur le tube en caoutchouc, on chasse l'air du tube de verre et l'on obtient les mêmes effets qu'avec la pipette à entonnoir décrite ci-dessus.

II

MICROSCOPE SIMPLE OU A DISSECTION.

Toute personne qui aborde l'étude de l'histoire naturelle d'une façon quelque peu étendue, doit nécessairement posséder les éléments de la physique. Exposer, avant d'aborder l'étude du microscope simple et composé, toute la théorie de la réfraction et des lentilles, nous paraît superflu. Mais le futur microscopiste doit connaître plus spécialement certains phénomènes d'optique ; nous trouvons donc utile d'en parler chaque fois que nous en aurons l'occasion dans le cours de cet ouvrage.

Certaines dissections délicates se pratiquent sous le microscope simple qui, d'ailleurs, est d'un usage fréquent dans les recherches.

Cet instrument est formé d'une lentille ou d'un groupe de lentilles remplissant le rôle d'un verre convergent. On sait, d'ailleurs, que les lentilles convergentes peuvent être bi-convexes, plano-convexes ou concaves-convexes ; dans ce cas, la face concave possède un rayon de courbure plus petit que la face convexe (ménisque convergent).

Pour qu'un verre convergent (fig. 5) donne une image agrandie (image virtuelle), il faut que l'objet AB examiné soit placé entre la lentille et le foyer F, mais très près de ce dernier. On construit l'image *ab* de l'objet AB en traçant l'axe principal HO, les axes secondaires passant par les extrémités A et B, des rayons lumineux A*m* et B*n* paral-

lèles à l'axe principal et qui sortiront de la lentille sans eouper les axes secondaires; mais du côté de l'objet, leurs prolongements A*m* et B*n* donneront l'image virtuelle *ab* agrandie.

La distanee DI entre l'objet et la lentille est appelée

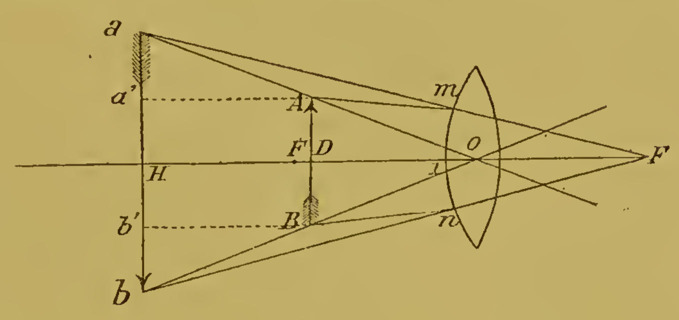


Fig. 5.

DISTANCE FRONTALE; *la distance* FO *est appelée distance focale.* C'est au point F, foyer prineipal, de la lentille que viennent se eouper les rayons parallèles à l'axe prineipal; on sait d'ailleurs qu'un objet se trouvant au point F ne donnerait que des rayons parallèles; eeux-ci ne pouvant eonverger, il n'y aurait point d'image.

Le grossissement ou l'amplification est le rapport entre *ab*, le diamètre de l'image, et le diamètre AB de l'objet (*ab* et AB étant ramenés à la même distanee).

Les triangles semblables AOB et *a*O*b* donnent $\frac{ab}{AB} = \frac{OH}{OD}$ (1).

Soit N l'amplifieation ou $\frac{ab}{AB}$, soit l = OH = la distance entre l'image *ab* et le eentre de la lentille.

Soit f la longueur focale sensiblement égale à OD, de telle sorte que ees deux valeurs puissent, sans inconvénient, être prises l'une pour l'autre.

On aura, en substituant dans (1) les différentes valeurs à leur égale que nous venons d'établir :

$$N = \frac{l}{f}.$$

Cette formule, dont il est souvent question, donne la valeur approchée du grossissement. Nous voyons que ce dernier est *approximativement égal à la distance de l'image à la lentille divisée par la distance focale.*

De tous les microscopes simples, le moins coûteux que nous connaissions est celui représenté par la figure 6. Il est construit par Zeiss à Jéna; il se compose d'un pied arrondi, massif, en fonte, portant une colonne sur laquelle est fixée une table percée d'une ouverture circulaire; une tige cylindrique pouvant s'élever et s'abaisser pour mettre au point porte un bras, sur lequel se fixe une loupe composée d'une ou de plusieurs lentilles. Les mouvements latéraux peuvent s'accomplir par la rotation de la tige cylindrique sur elle-même.

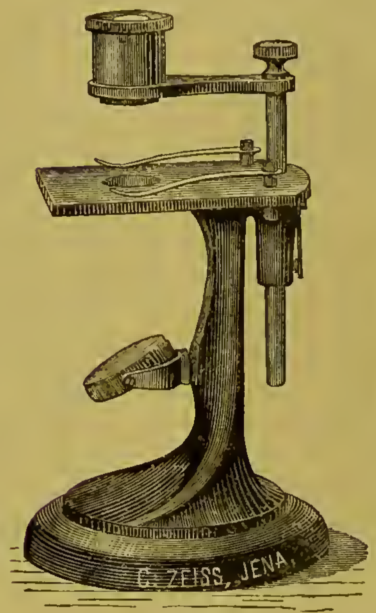


Fig. 6.

Un miroir mobile sur un axe est attaché à la colonne sous la table. Deux valets permettent de fixer la préparation quand la chose est nécessaire. Le constructeur rend ce microscope plus maniable en le fixant sur une pièce en bois massif, pareille au pied du microscope représenté par la figure.

Un microscope simple du même fabricant, plus complet

que celui que nous venons de décrire, est formé d'un pied en bois massif, d'une colonne arquée portant, outre la table

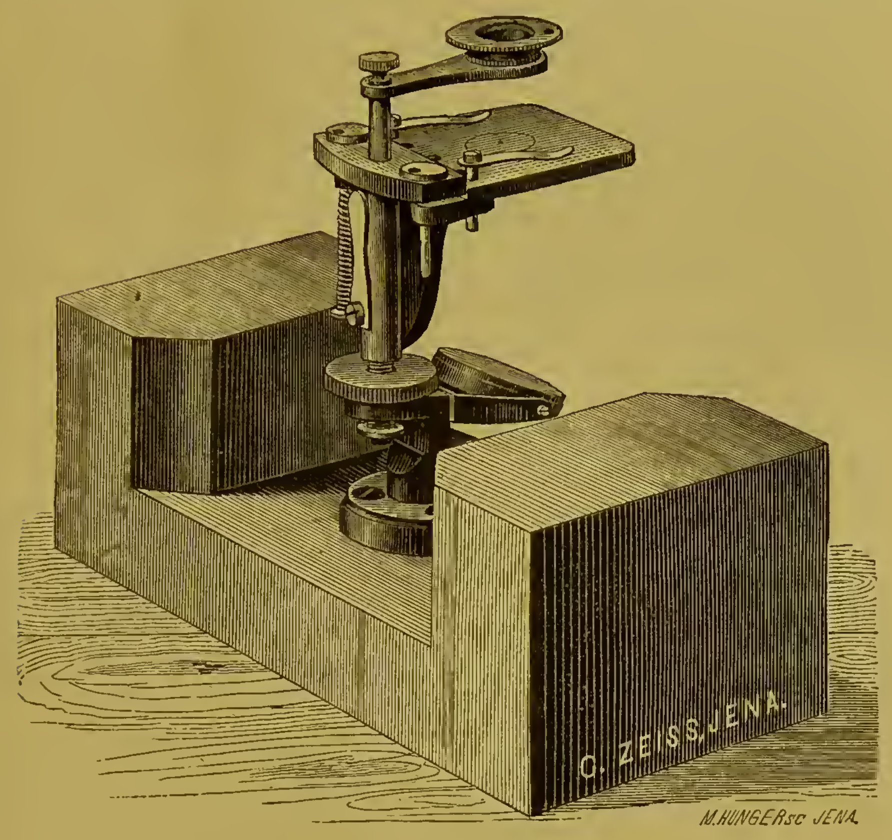


Fig. 7.

et le bras porte-loupe, comme précédemment, une vis de rappel pour mettre au point; un ressort à boudin, figuré à gauche de la colonne, intervient dans le mouvement.

Enfin, disons un mot d'un appareil excellent (fig. 8), mais plus coûteux, réunissant, d'ailleurs, toutes les conditions mécaniques désirables. Le pied rectangulaire en laiton massif lui donne une grande stabilité; une colonne cylindrique supporte la table; à celle-ci sont adaptées deux lames métalliques pour appuyer les mains pendant le travail. Le

mouvement du bras porte-loupe se produit d'une façon précise par l'intermédiaire d'une crémaillère commandée par une double virole agissant sur une roue dentée.

Le miroir est à articulation ; il peut être transporté dans

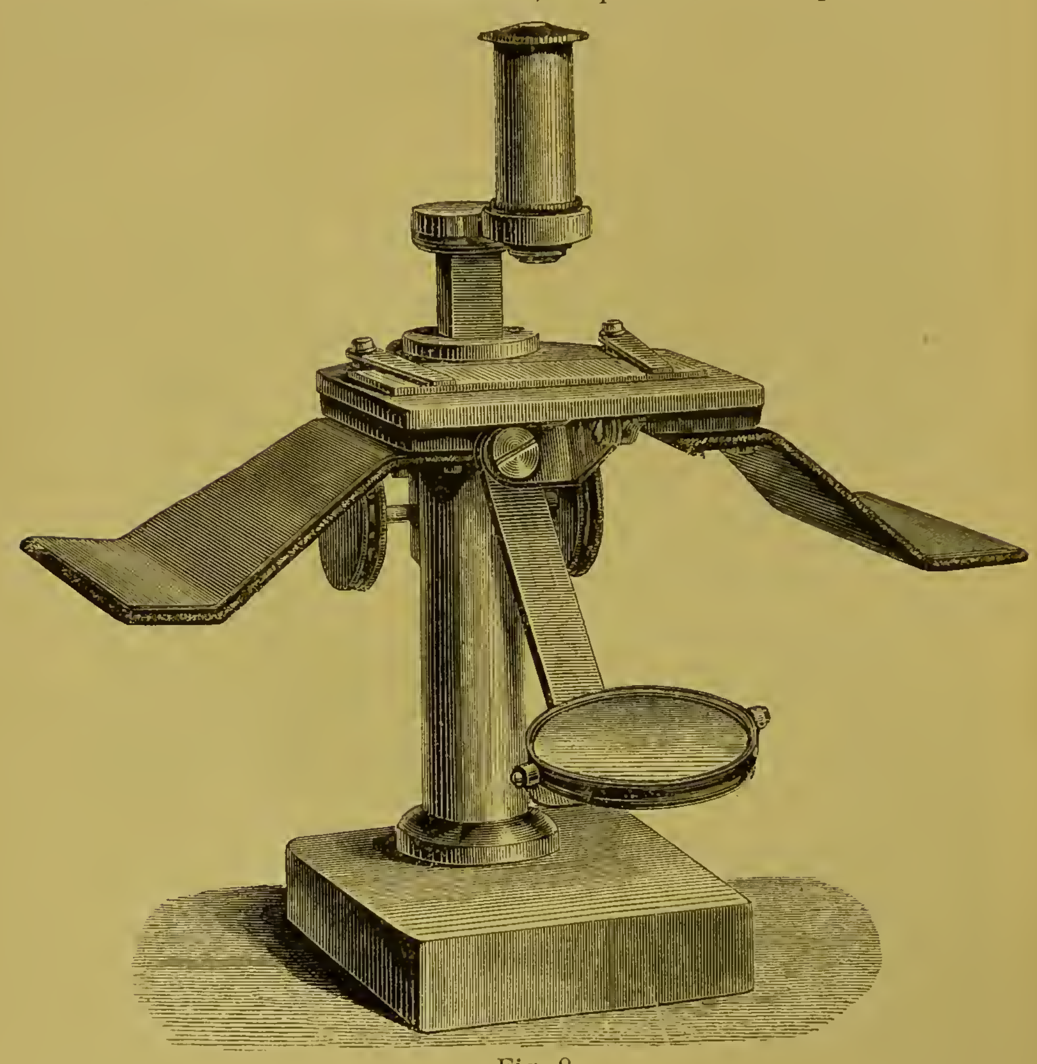
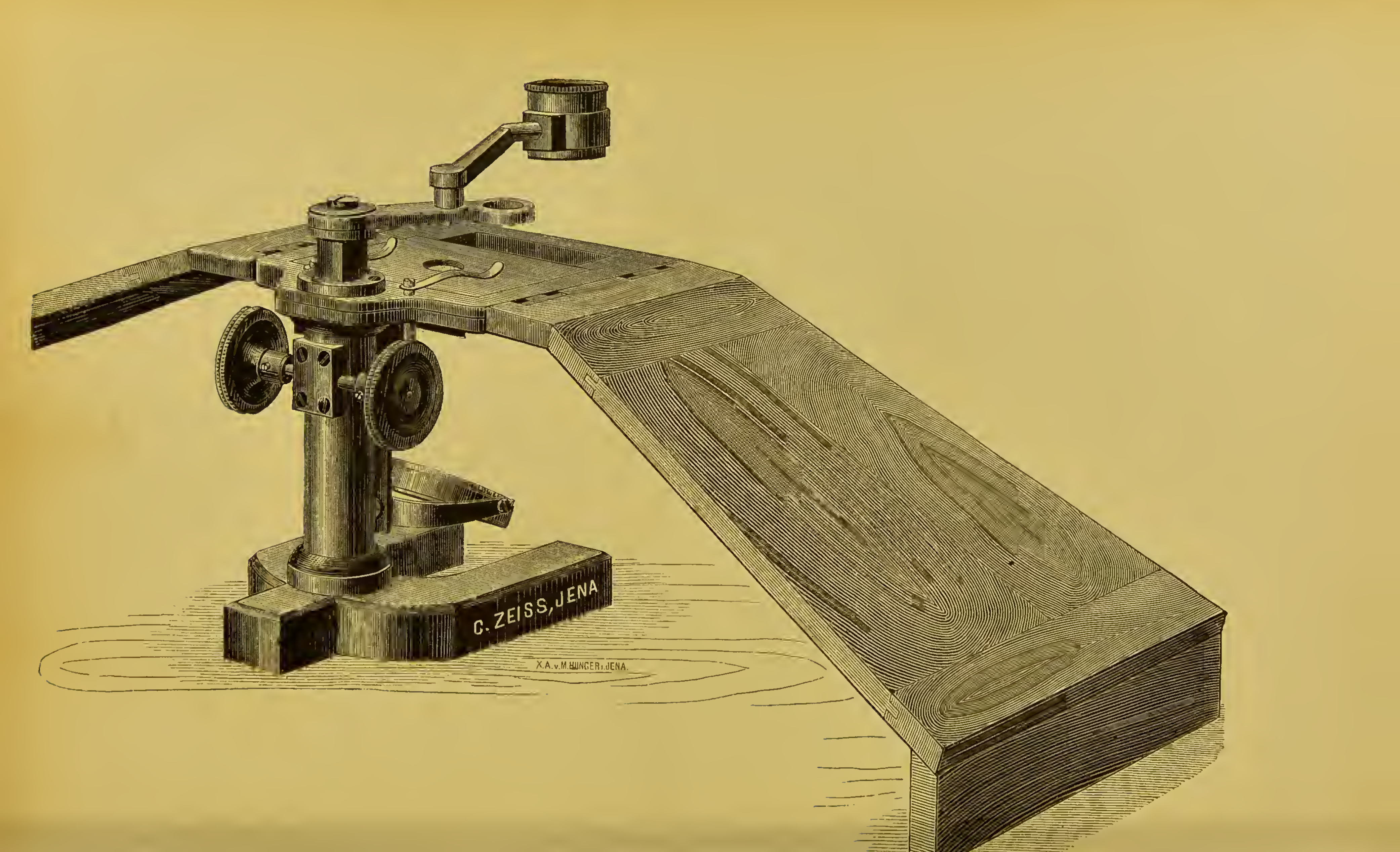


Fig. 8.

tous les sens ; l'éclairage au-dessus de la table est même possible.

Le microscope, comme il est représenté par la figure 8,


C. ZEISS, JENA
X.A. v. M. HUNGER, JENA.

est muni d'une loupe formée de deux lentilles, qui, combinées, donnent un grossissement de 10; le diamètre du champ est d'environ 13 millimètres; la distance entre la lentille inférieure et l'objet est de 1 centimètre.

Si l'on dévisse la lentille supérieure pour ne conserver que l'inférieure, le grossissement n'est plus que de 5; mais le champ est considérable et la distance frontale est alors de 2 1/2 centimètres. Cette loupe peut être employée à main et sans support.

Récemment Zeiss, d'après les conseils de Paul Mayer, a construit un microscope simple remarquable et qui réunit toutes les conditions pratiques d'un bon instrument (fig. 9). Le pied est en forme de fer à cheval; la table est formée d'un grand cadre en métal, à laquelle on applique des appuis en bois pour les mains; la mise au point se produit par une crémaillère comme dans le microscope précédent. L'ouverture de la platine peut être fermée inférieurement par une plaque noire ou blanche suivant les besoins. Quand l'observation porte sur de grands objets, tels que les animaux aquatiques, on emploie des loupes aplanatiques (6 à 10 fois) que l'on place dans un support spécial par l'intermédiaire d'un bras qui peut occuper toutes les situations au-dessus de la table. Pour de semblables recherches, la table en métal est remplacée par une lame de verre; sous celle-ci sont appliquées des plaques noires ou blanches pour donner des fonds clairs ou obscurs. Par une disposition spéciale, la chambre claire d'Abbe se combine avec les loupes aplanatiques. On parvient ainsi à dessiner des objets assez grands sous une faible amplification.

Les doublets imaginés par Wollaston, en 1820, et plus

tard perfectionnés par Chevalier, sont formés de deux lentilles plano-convexes dont les deux faces planes sont tournées vers l'objet. Le tout joue le rôle d'un seul verre.

L'expérience démontre que deux lentilles ainsi superposées sont affectées d'une aberration de sphéricité beaucoup moindre qu'une seule lentille dont la longueur focale serait égale à celle des deux premières combinées.

Les doublets que nous recommanderions sont ceux de 30 fois, si l'on se procure en même temps la loupe décrite plus haut. La distance frontale est relativement très grande; elle est de 3 à 4 millimètres, ce qui permet encore les dilacérations et certaines dissections.

On peut aussi ne se servir que de la lentille supérieure seule; mais alors l'amplification de l'image est diminuée de

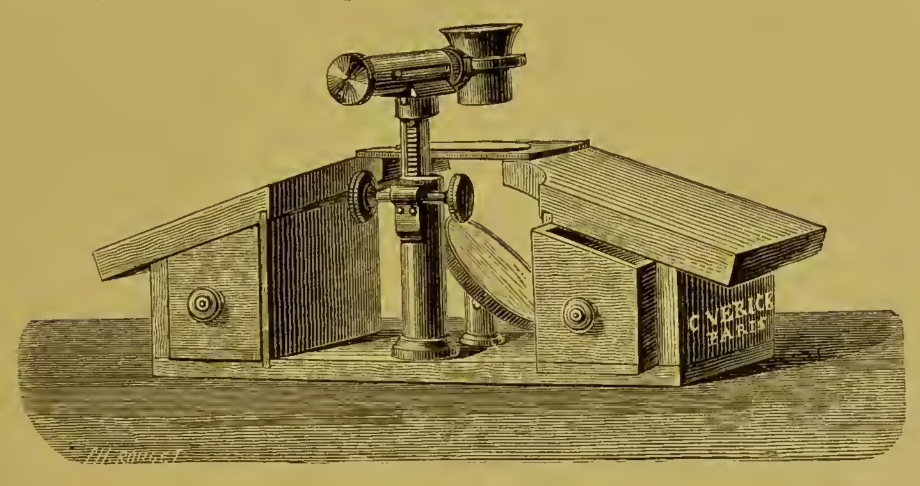


Fig. 10.

moitié. La lentille inférieure employée seule donne une aberration de sphéricité considérable.

Deux loupes de Brucke s'adaptent aux microscopes à dissection qui précèdent. L'une donne des grossissements de 100, 60 et 40 diamètres; l'autre amplifie 30 fois l'image.

Elles sont formées l'une et l'autre de lentilles achromatiques jouant le rôle d'objectifs, qui, combinées, donnent l'amplification la plus élevée. En enlevant un ou deux doublets, on diminue le grossissement. La lentille supérieure du système, un véritable oculaire, est formée d'une lentille plano-concave divergente.

Nachet, Verick, Hartnack construisent également de bons microscopes simples.

La figure 10 montre le microscope simple construit par Verick. Cet instrument se compose d'un support en acajou et d'une colonne verticale avec un mouvement à crémaillère pour le déplacement rapide des lentilles. On y adapte 3 lentilles donnant des grossissements de 6 à 15 diamètres.

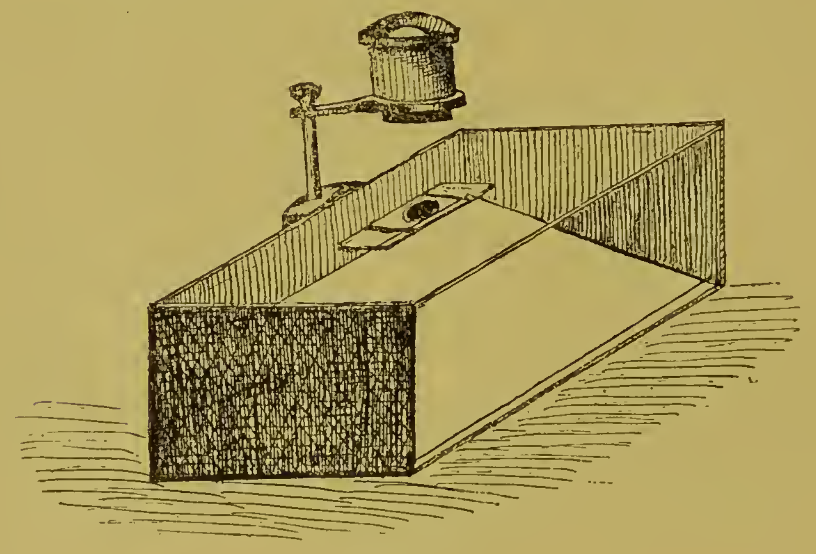


Fig. 11.

Quant à la platine, nous conseillons de la remplacer par un cadre où l'on puisse à volonté fixer une plaque percée d'une ouverture circulaire ou une lame de glace comme Paul Mayer l'a proposé. Cette modification, d'ailleurs, sera utile-

ment apportée au microscope simple de n'importe quel constructeur.

Mentionnons, pour terminer, le microscope simple de Nachet, obtenu à l'aide du microscope de voyage de ce constructeur. Nous en reparlerons, d'ailleurs, plus tard. Constatons seulement que les doublets fournis avec cet appareil sont excellents, à *grande distance frontale et à grand champ bien aplanatique.*

Photophore de Ranvier (fig. 11). — Ce petit instrument que l'on peut confectionner facilement est formé d'une petite boîte en bois de 5 centimètres de haut, 10 de long et de large. La face supérieure est remplacée par une lame de glace; la face antérieure est supprimée. Dans la caisse, on dispose un miroir incliné d'environ 30° sur l'horizontale. Les objets à examiner, placés dans des verres de montre ou sur des lames, seront ainsi portés sur la glace supérieure. Le miroir incliné y envoyant la lumière, l'étude par transparence sera ainsi possible. Dans toutes les opérations où les préparations doivent être examinées à l'œil nu ou à un faible grossissement avec la loupe à main, la loupe de Brucke, etc., le photophore sera toujours employé avec succès; on s'en servira donc dans les fines dissections ainsi que dans les dilacérations.

Si, dans les débuts, les commençants n'avaient pas les ressources nécessaires pour se procurer un microscope simple, ils se construiraient un photophore de Ranvier auquel ils adapteraient un bras porte-loupe en fil de fer plié à angle droit et terminé à l'une des extrémités par un anneau : l'autre extrémité se fixerait dans une glissière. Une loupe ou un doublet serait placé dans l'anneau. En remontant ou en

redescendant le bras dans sa glissière, on mettrait au point comme on le fait avec le microscope représenté par la figure 6.

Dans les dissections, la loupe de Brucke formée d'une lentille oculaire plano-concave et d'un objectif ordinairement achromatique peut rendre de grands services. Elle doit être supportée par un bras articulé pouvant monter et redescendre le long d'une colonne verticale enfoncée dans un pied massif en métal. On peut également la placer sur le microscope ordinaire en enlevant le tube.

Cet accessoire coûte de 50 à 60 francs, quel que soit le constructeur qui le fournisse. Cependant, Nachet cote la loupe de Brucke et le support à crémaillère au prix de 36 francs.

Pour dessiner des objets tels que des embryons sous une faible amplification, quand on n'a pas tout l'outillage d'un laboratoire complet à sa disposition, voici ce que nous conseillons de faire : 1° On unit par un anneau la chambre d'Oberhäuser avec un oculaire renversé de telle sorte que le verre collecteur regarde le prisme de la chambre ; sur un support analogue au bras de la loupe du photophore de Ranvier, on attache ainsi l'appareil, le verre de l'œil au-dessus de l'objet à examiner. En regardant dans le petit prisme de la *camera,* on aperçoit l'objet grossi de 10 à 20 fois. 2° On combine un doublet faible ou une loupe également faible (5 à 10 fois) avec la chambre claire de Nachet; on attache convenablement, comme il est indiqué précédemment, au-dessus de l'objet à étudier disposé convenablement sur le photophore de Ranvier. On est obligé de dessiner sur la plaque de verre même de ce dernier appareil en y appliquant

le papier. — Avec la chambre claire d'Abbe, on procéderait de même. — Ce sont là des dispositions qui peuvent tenir lieu jusqu'à un certain point des instruments perfectionnés que nous avons décrits. Nous ne prétendons nullement qu'elles remplacent complètement ceux-ci, mais l'amateur ou l'étudiant seront heureux d'y recourir en cas de nécessité.

III

MICROSCOPE COMPOSÉ.

Le microscope composé réduit à sa plus simple expression est représenté par deux lentilles convergentes. La première

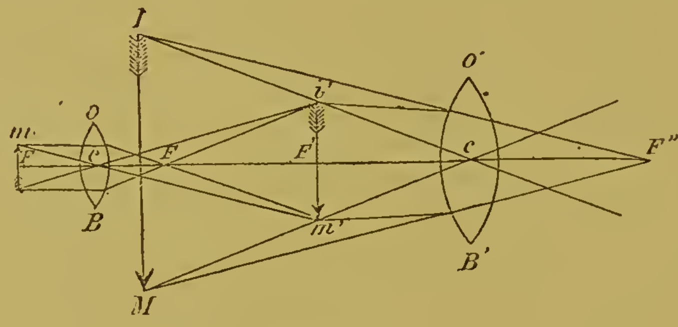


Fig. 12.

OB (fig. 12), à court foyer, l'objectif, donne une image *i'm'* réelle, renversée et amplifiée de l'objet *im* placé au delà et très près du foyer principal F. La seconde lentille O'B', l'oculaire, à foyer plus long, est placée de telle sorte qu'entre elle et son foyer principal F' vienne se former l'image aérienne *i'm'*; l'oculaire fonctionne donc comme une loupe; en recueillant l'image *i'm'*, il en donne une image IM virtuelle et agrandie.

Par l'examen de la figure, on se rappellera que pour construire graphiquement l'image fournie par le microscope, il suffira de tracer :

1° L'axe principal passant par les centres c et c' des lentilles;

2° De mener les axes secondaires ii', mm';

3° Des rayons parallèles qui couperont les axes secondaires et formeront l'image réelle $i'm'$;

4° De celle-ci, on construira l'image virtuelle IM, produite par le verre $O'cB'$, comme s'il s'agissait d'une loupe.

En étudiant la figure 12, on se convaincra facilement :

1° Que l'image donnée par le microscope est renversée par rapport à l'objet examiné;

2° Que l'amplification définitive obtenue par le microscope est le produit du grossissement de l'objectif par celui de l'oculaire. Si, par exemple, la lentille OB grossit 3 fois, l'oculaire 2 fois, on aura avec ces deux verres combinés en microscope composé, une amplification définitive de 3×2. Si l'objectif est affecté d'un défaut et donne des images défectueuses, celles-ci amplifiées montreront ces défectuosités en les exagérant d'autant plus que l'oculaire est plus fort;

3° Que si la distance cc' entre les deux verres augmente, l'image réelle $i'm'$ grandit proportionnellement et par conséquent l'image IM s'amplifie également;

4° Que plus le *foyer de l'objectif est court*, plus l'image réelle $i'm'$ sera grande; de là encore amplification de l'image IM;

5° Que plus le foyer de l'oculaire est court, plus l'image virtuelle sera grande.

Pour bien saisir ce qui précède, nous engageons les lecteurs, ceux-là surtout dont les connaissances en optique ne sont pas très étendues, à répéter la construction que nous donnons en modifiant les diverses conditions de façon à

vérifier graphiquement les cinq propositions ci-haut énoncées.

Nous avons supposé le microscope dans les conditions les plus simples afin de tirer certaines conclusions. Nous verrons plus loin que la théorie de la vision microscopique n'est pas aussi simple que nous venons de le décrire. Dans la formation des images, il intervient des phénomènes de diffraction que le futur microscopiste ne doit pas ignorer sans s'exposer à de graves erreurs.

L'objectif et l'oculaire sont les pièces principales du microscope; ils constituent avec le miroir ce que la plupart des auteurs appellent la PARTIE OPTIQUE de cet instrument.

Le support, le statif des micrographes et constructeurs allemands forme la partie mécanique. Celle-ci peut varier de forme et de grandeur.

PARTIE MÉCANIQUE.

Le pied du microscope est en laiton ou en fonte; il est ordinairement en forme de fer à cheval; il doit être large et assez lourd pour assurer une grande stabilité à l'instrument. Le pied supporte la colonne sur laquelle sont fixés le tube, la table et le miroir.

Au tube s'adaptent l'oculaire et l'objectif; il glisse le plus souvent à frottement doux dans une douille; celle-ci est reliée à la colonne par un bras. En descendant ou en relevant le tube dans la douille, on produit le mouvement rapide; dans les grands instruments, ce mouvement est obtenu par une crémaillère appliquée sur le tube. Une roue dentée commande celle-ci; elle permet de relever ou d'abaisser rapi-

dement le tube en tournant la double virole avec laquelle elle est en communication.

Le tube peut être à tirage, ce qui permet d'augmenter la distance entre l'objectif et l'oculaire; on pourra amplifier ainsi l'image en vertu de la troisième proposition énoncée plus haut.

Une *vis micrométrique* appliquée au sommet de la colonne agit sur une pièce prismatique portant le tube et emboîtée dans toute la longueur de la colonne; un ressort à boudin agissant de bas en haut et caché dans celle-ci oblige le prisme à suivre tous les mouvements de la vis micrométrique; cette dernière est mue par une virole. On obtient par le mécanisme qui précède le mouvement lent si utile dans toutes les recherches.

La table ou platine sur laquelle sont placées les préparations, est appliquée à angle droit sur la colonne; elle est percée d'une ouverture circulaire; elle est peinte à l'aide d'un vernis noir; certain constructeur la recouvre d'une lame de verre dépoli et noir ou bien encore d'une plaque d'ébonite.

Sous la platine sont adaptés les diaphragmes; ils peuvent être constitués par une plaque tournante offrant des trous circulaires de différents diamètres. Cette disposition est la moins avantageuse, car le décentrage se produit bientôt. Les diaphragmes que l'on introduit dans un cylindre supporté par une pièce glissant comme un tiroir sous la platine sont bien préférables. Dans ce cas, le centrage est moins sujet à s'altérer. En outre, on peut encore faire varier la distance entre la préparation et le diaphragme et obtenir tous les effets d'éclairage désirables; enfin, dans le porte-diaphrag-

mes, il est possible de placer des verres colorés, des condenseurs et même l'appareil polarisateur.

Un microscope à diaphragmes tournant coûte en moyenne 7 à 10 francs en moins que le même instrument muni de diaphragmes à cylindre. On n'hésitera donc pas à se procurer cette dernière disposition.

PARTIE OPTIQUE.

L'objectif. — L'objectif se visse à l'extrémité inférieure du tube ; il peut être formé d'une seule lentille achromatique si le grossissement est faible. Ordinairement, trois verres convergents achromatisés interviennent dans la formation de l'objectif.

La lentille inférieure, tournée vers l'objet à examiner, s'appelle *lentille frontale*. Pour la facilité de description nous nommerons la lentille tournée vers l'oculaire, la lentille supérieure ou émergente.

Les objectifs sont à sec ou à immersion ; dans ce dernier cas, la lentille frontale est unie à l'objet à examiner par l'intermédiaire d'un liquide qui peut être l'eau (immersion à eau) ou bien par une huile spéciale (immersion homogène).

Les anciens objectifs présentaient un grave inconvénient ; comme les prismes, ils dispersaient les rayons lumineux en les faisant dévier. Les images, manquant de netteté, apparaissaient irisées ; ce phénomène constitue ce que l'on appelle *aberration chromatique* ou de *réfrangibilité*.

Pour en donner une idée exacte, supposons une lentille de *crown-glass* recevant deux rayons lumineux RR (fig. 13).

Théoriquement, ces rayons devraient se rencontrer au

foyer; mais il n'en est pas ainsi. Les rayons simples en entrant dans la lentille en sortent décomposés en sept faisceaux correspondant aux couleurs du spectre.

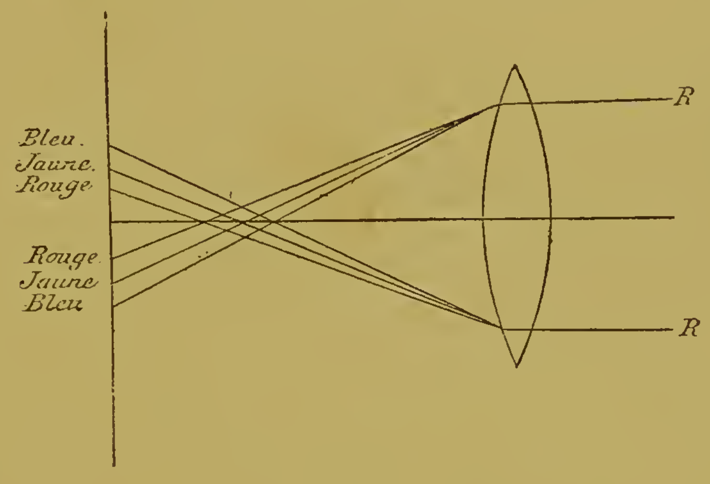


Fig. 13.

Comme *ces divers rayons sont inégalement réfrangibles*, il s'ensuit qu'ils viennent couper l'axe principal en sept endroits différents. Le rayon extrême rouge, à indice de réfraction moindre, a son foyer plus éloigné de la lentille; le rayon violet extrême, dont l'indice de réfraction est plus élevé, est réfracté en un point plus rapproché de la lentille.

Puisque des rayons lumineux partant d'un même point se décomposent en donnant plusieurs foyers, l'image doit manquer de netteté et paraître irisée.

L'aberration de réfrangibilité fut corrigée, en 1824, pour la première fois d'une façon convenable, par Chevalier. Reprenant les travaux d'Euler, celui-ci forma des objectifs de lentilles plano-concaves de flint dans lesquelles il enclavait des lentilles de crown; il imagina aussi de réunir les verres par la térébenthine ou le baume.

Le crown-glass (silicate de potasse et de chaux) disperse peu la lumière ; le flint (silicate de plomb et de potasse) la disperse plus. On conçoit qu'en combinant deux lentilles, l'une convergente et peu dispersive de la première substance, l'autre de la seconde substance, fortement dispersive, l'aberration chromatique soit ainsi corrigée.

Les objectifs à sec sont ordinairement formés de trois lentilles. Dans le principe, chacune de celles-ci était achromatisée. Déjà Amici avait construit des objectifs au moyen de trois lentilles non achromatiques. Il parvenait à obtenir l'achromatisme d'ensemble en plaçant les verres à des distances convenables l'un de l'autre.

Actuellement, la plupart des opticiens emploient trois lentilles pour former leurs objectifs. La lentille du milieu seule est achromatique ; dans la lentille supérieure, le flint a le plus d'épaisseur; seule, elle donnerait donc une bordure bleuâtre aux objets. La lentille inférieure, au contraire, est constituée uniquement de crown ou tout au moins ce dernier prédomine; il en résulte que seul ce verre affecterait les images d'une bordure jaune.

En résumé, en combinant les trois verres et en les plaçant à des distances respectives convenables, l'aberration de réfrangibilité n'est presque plus sensible ; toutefois, dans la pratique, on n'obtient jamais un achromatisme parfait. Les objectifs offrent une lueur bleuâtre ou jaunâtre : dans ce dernier cas, on les dit corrigés par défaut ; dans le premier, ils sont corrigés par excès ; tels sont ceux adoptés par presque tous les opticiens. Il importe qu'un objectif soit aussi bien achromatisé que possible.

ABERRATION DE SPHÉRICITÉ.

Soit la lentille convergente épaisse et à grande ouverture, et soit une série de rayons R^1, R^2, R^3, etc. Les rayons

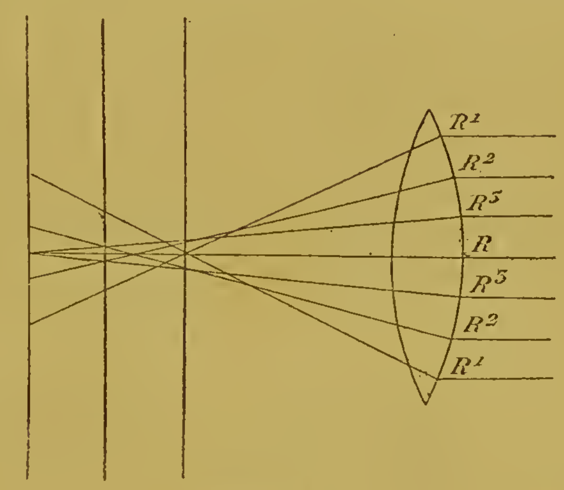


Fig. 14.

qui émergent près du bord R^1, R^2 sont déviés plus fortement que ceux (R^3) qui sont près de l'axe principal R ; les rayons émergeant près du bord rencontrent l'axe plus près de la lentille que les rayons R^3.

Ce défaut de concours des rayons en un même point constitue l'aberration de sphéricité. Quand on reçoit, sur un écran (fig. 15), l'image d'une bougie, l'image focale manque de netteté parce qu'elle apparaît entourée d'une auréole.

En plaçant un écran entre la bougie et la lentille de façon à intercepter les rayons annulaires, l'auréole disparaît et l'image apparaît plus nette ; par contre, si les rayons centraux R^3 sont à leur tour interceptés, l'image devient confuse.

En combinant deux ou plusieurs lentilles, en opposant leur

aberration de sphéricité, on parvient à diminuer et même à faire disparaître complètement ce défaut. Par l'emploi de

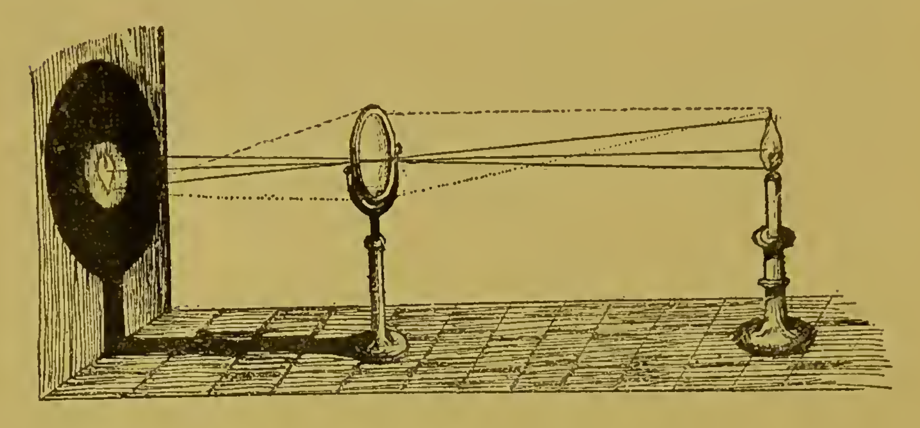


Fig. 15.

diaphragmes, on fait disparaître les restes d'aberration de sphéricité qui pourraient affecter encore un objectif.

RÉSOLUTION, DÉFINITION, PÉNÉTRATION.

On entend par *pouvoir résolvant* ou *séparateur* la propriété en vertu de laquelle un objectif peut rendre visibles plus ou moins facilement les éléments les plus minimes, tels que de fines lignes, des stries, etc. (On se fera une idée exacte de *la résolution* et de son essence, quand on aura étudié la théorie de la formation des images microscopiques.)

Le pouvoir résolvant ne dépend pas du grossissement, comme on le croirait à première vue; l'expérience prouve, en effet, qu'un objectif donnant une amplification considérable peut accuser moins bien les fines stries qu'un autre grossissant moins, mais qui montre mieux les menus détails. On verra, avec un bon instrument donnant 200 diamètres, de fines

structures, tandis qu'un objectif moins bon, donnant 500 diamètres, par exemple, ne montrera pas ces fins détails.

Nous établirons par la suite que la résolution est en raison directe de l'ouverture; par conséquent, elle dépend de la plus ou moins grande quantité de rayons lumineux admis à former l'image.

La table de Stephenson, donnée plus loin, exprime le nombre de lignes que résolvent des systèmes d'objectifs de différentes ouvertures.

Un objectif qui aurait une ouverture numérique de 1.52 et qui correspondrait donc à un angle de 180° dans le baume résoudrait 146,528 lignes par pouce; c'est dans la lumière blanche, la plus haute résolution qu'il est possible d'atteindre, si un pareil objectif pouvait être construit.

Le pouvoir définissant d'un objectif est la capacité qu'il possède d'accuser plus ou moins fidèlement les contours des objets; cette qualité dépend de la correction plus ou moins parfaite des aberrations de réfrangibilité et de sphéricité du système; mieux les objectifs seront corrigés, plus fidèlement accuseront-ils les contours des objets.

C'est en examinant un objet à formes bien connues, tel qu'une diatomée, une écaille de papillon, un corpuscule sanguin, que l'on appréciera si un instrument jouit de la propriété que nous étudions actuellement.

On dit qu'un objectif est *pénétrant* quand il montre à la fois tout ce qui est placé sur plusieurs plans successifs et très rapprochés dans l'épaisseur d'un objet soumis à l'examen. Abbe a établi une formule $\frac{1}{a}$ (a = ouverture numérique) en vertu de laquelle on exprime la pénétration (profondeur

focale) relative des objectifs. Cette formule nous montre que la pénétration est en raison inverse de l'ouverture numérique. La table de Stephenson donne la pénétration de différents systèmes en même temps que les résolutions.

Si l'on interprète la formule ci-dessus, on voit que les objectifs à grande ouverture sont, quant à leur pénétration, en raison inverse de la résolution : le pouvoir séparant exclut donc le pouvoir pénétrant.

Pour les objectifs forts et à grande ouverture, théoriquement la pénétration est regardée comme un défaut. Avec de telles lentilles, il faut considérer les objets en les supposant divisés en une série de plans mathématiques, véritables coupes optiques, que l'on superpose ensuite par la pensée.

Mais pour le travail courant, avec des objectifs de faibles et de moyennes ouvertures, une bonne pénétration est nécessaire. En histologie et dans la plupart des travaux d'anatomie comparée, la pénétration des objectifs est une qualité appréciée par tout le monde.

Mais on aurait tort d'exiger une bonne pénétration d'un objectif fort.

ANGLE D'OUVERTURE.

L'angle d'ouverture d'un objectif est formé par les rayons extrêmes émanés d'un objet et qui concourent à former une image définie. C'est la définition unanimement adoptée par tous les auteurs; nous nous garderons bien de rien y changer.

On a proposé un grand nombre de moyens pour mesurer l'ouverture angulaire des lentilles; des instruments plus ou

moins compliqués ont été inventés pour parvenir à ce but; le plus parfait, à notre avis, est l'*apertomètre d'Abbe;* il est formé d'un disque hémi-circulaire de glace, taillé sur le diamètre libre en un biseau qui sert ainsi de prisme réflecteur.

Au centre et au-dessus du biseau, se trouve le point où l'on ajuste l'objectif pour les observations. Sur la circonférence du disque, se trouvent deux graduations, l'une donnant l'ouverture angulaire, l'autre l'ouverture numérique. Dans le microscope, pour faire des observations, on est obligé de visser un objectif spécial qui transforme ainsi l'instrument en lunette.

Mais nous croyons être utile en décrivant deux procédés faciles et suffisamment exacts qui permettront à l'étudiant de vérifier la valeur de leurs objectifs sans le secours d'aucun appareil nouveau.

Triangle d'Amici. — L'objectif dont on veut connaître l'ouverture angulaire étant vissé au tube du microscope, on le descend, de façon que la *frontale* arrive exactement au niveau de la platine; le miroir étant écarté, on place à une certaine distance sur la table où l'on travaille (cette dernière est recouverte d'un papier noir) deux fragments de papier A et B (fig. 16); regardant dans le tube, l'oculaire étant enlevé, on les écarte jusqu'à ce qu'ils commencent à disparaître; ils sont alors comme tangents aux lentilles de l'objectif; c'est, du moins, l'illusion que l'on perçoit.

Un triangle A*c*B se trouve ainsi formé; il sera facile de le construire graphiquement à l'aide de la règle et du compas; pour arriver à ce but, on mesure la distance A et B; on reporte sur la perpendiculaire au point H, milieu de AB, la dis-

tance Hc, entre la platine et la surface sur laquelle les papiers A et B se trouvent placés; on joint les points A et B au point c; on a le triangle AcB, dont l'angle du

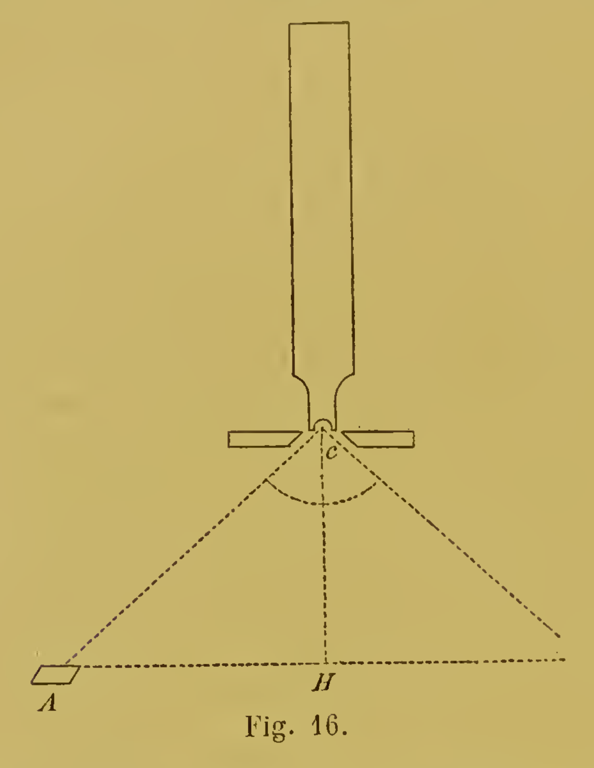


Fig. 16.

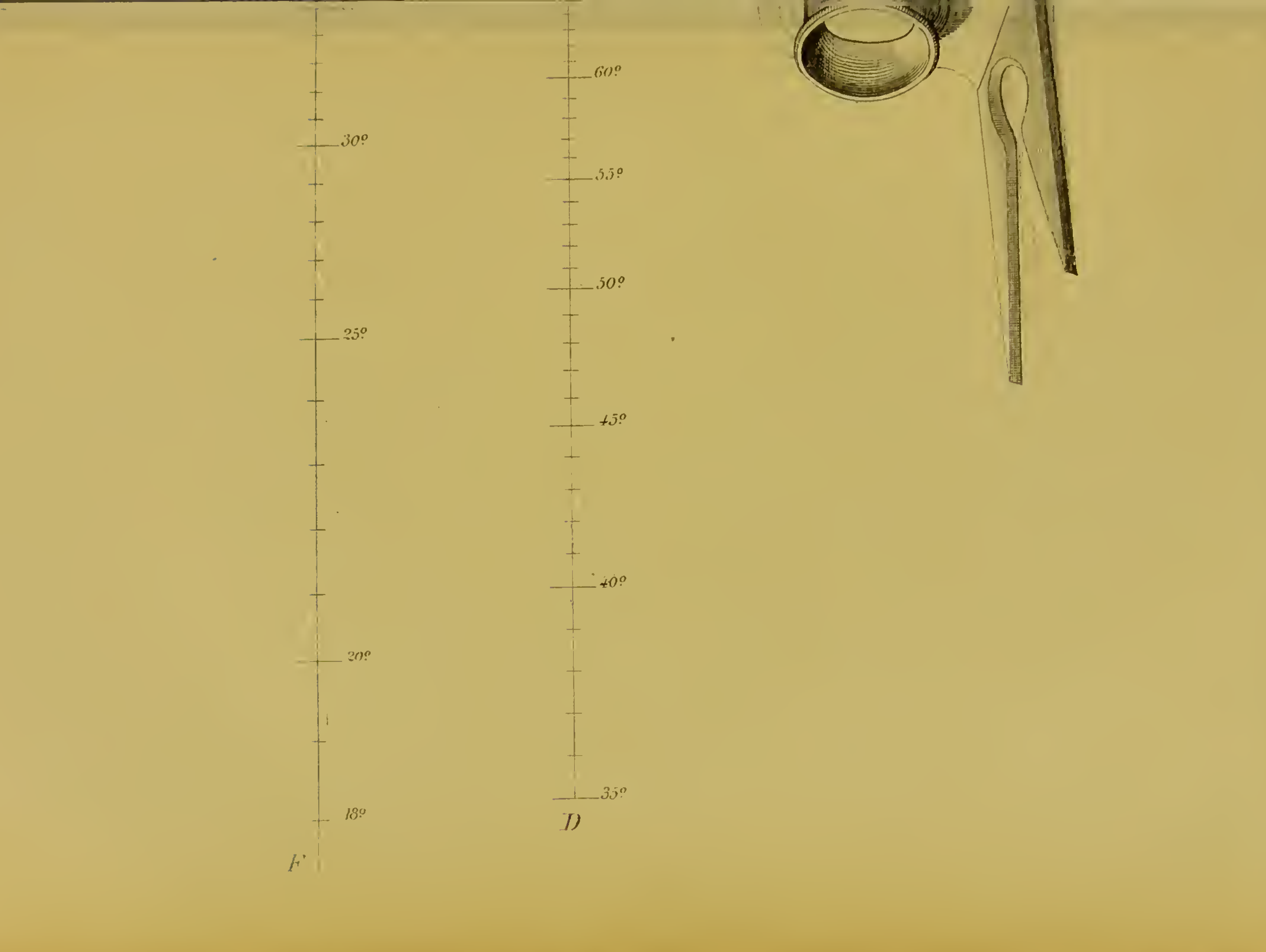
sommet AcB exprimera l'ouverture angulaire cherchée. Ce procédé n'est évidemment applicable qu'aux objectifs à sec.

Échelle de Stephenson (planche à la fin du livre). — Ce savant micrographe, qui s'est distingué surtout par de grands perfectionnements apportés au microscope, a imaginé une modification au moyen qui précède; la mesure de l'angle est donnée immédiatement en chiffres sur une échelle graduée.

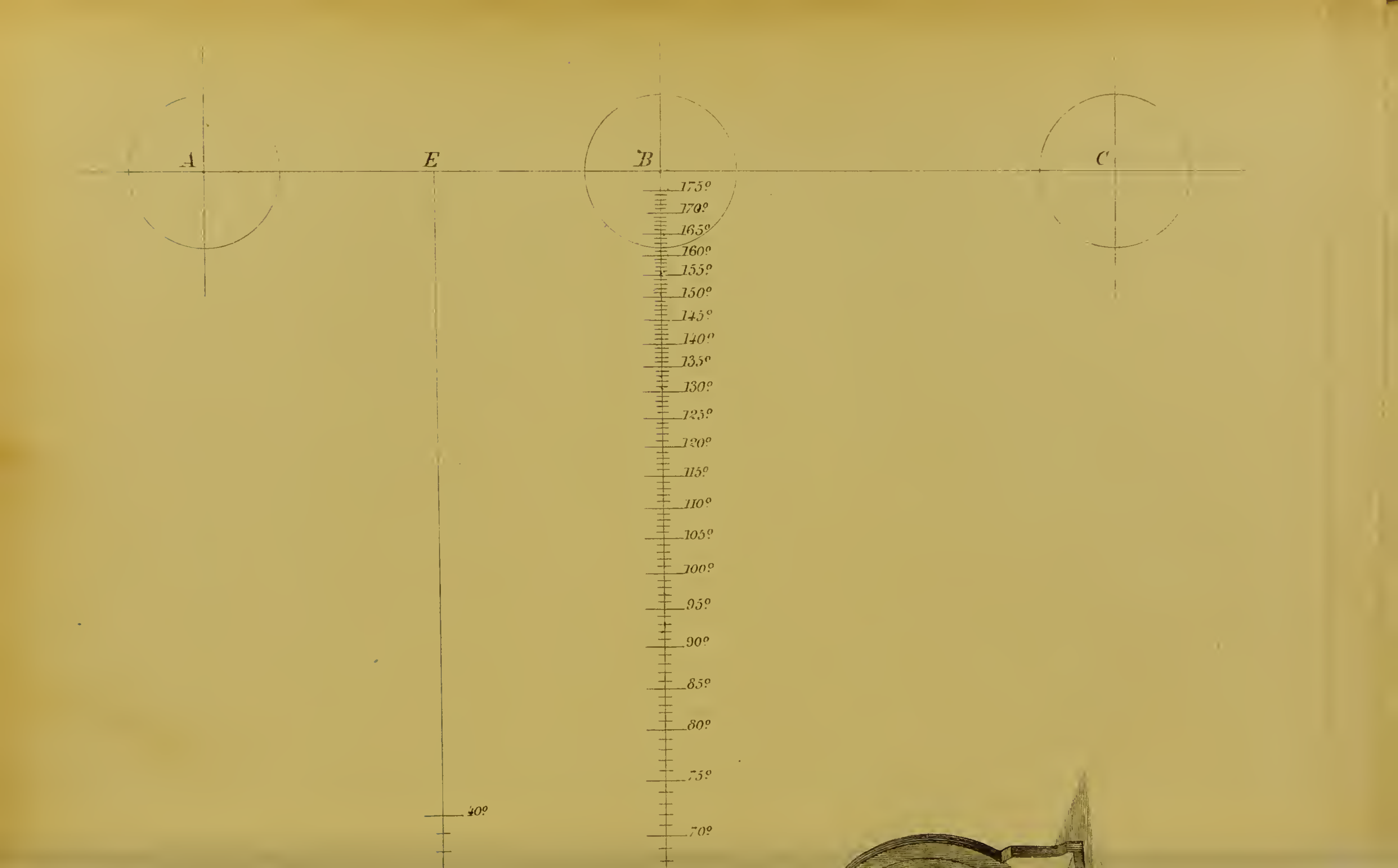
Pour trouver l'angle d'ouverture par ce procédé, une échelle que nous reproduisons telle que l'auteur l'a tracée est nécessaire (fig. 107); une pièce P est recommandée par

ÉCHELLE DE STEPHENSON

Coller la présente feuille sur bristol pour s'en servir suivant les indications de la page 42.



F
18°
20°
25°
30°
D
35°
40°
45°
50°
55°
60°


A
E
B
C
175°
170°
165°
160°
155°
150°
145°
140°
135°
130°
125°
120°
115°
110°
105°
100°
95°
90°
85°
80°
75°
70°
40°

l'auteur, mais nous nous sommes servi avec autant de succès du tube enlevé au statif et sur lequel nous vissons l'objectif à essayer.

Deux objets brillants, deux aiguilles, par exemple, sont placées en A et C ; on fait glisser de bas en haut le tube sur la ligne BD, l'objectif tourné vers A et C; on arrive bientôt à voir les premiers rayons lumineux partant de A et de C pénétrer tangentiellement dans l'objectif; les aiguilles commencent à apparaître à droite et à gauche ; au moment où les premiers rayons se montrent ainsi, on fixera le tube, et prenant comme indice la lentille frontale, on consultera la graduation; comme vérification, on remontera l'échelle; d'abord, A et C apparaîtront complètement, puis, les rayons extrêmes seuls seront visibles comme on vient de le voir; au moment où ils disparaîtront, on fixera le tube et on consultera l'échelle.

Quand on se sert du tube du microscope pour cet usage, on aura soin de le tenir toujours exactement sur la ligne BD sans déviation aucune. Il est évident que dans les deux essais précédents, on devra arriver au même résultat.

Si on se donne la peine de faire quelques essais, on aura la mesure suffisamment exacte de l'ouverture angulaire. Les commençants s'exerceront, d'abord, avec des objectifs à faible ouverture, soit 50° à 75°.

Comme objets (A et C) brillants, nous prenons le plus souvent les boîtes en laiton où l'on enferme les objectifs ; on les éclaire en plaçant une lampe à une certaine distance vers D. Les surfaces convexes polies donnent une ligne brillante et miroitante que nous faisons coïncider avec le point A. En

consultant la figure avec attention, on voit qu'il est inutile de placer un objet en C.

Pour les angles plus petits que 40°, on se servira de la ligne EF comme échelle.

Il importe, comme nous le verrons plus loin, de connaître l'angle d'ouverture des objectifs.

OUVERTURE NUMÉRIQUE.

Il n'y a pas bien longtemps, il s'éleva entre les microscopistes anglais des discussions orageuses relativement à l'ouverture des objectifs. Que fallait-il entendre par ouverture et quel était le moyen d'apprécier la valeur optique relative des lentilles? Telle était l'importante question à élucider.

Deux partis se trouvaient en présence. L'un soutenait l'ancienne THÉORIE ANGULAIRE : il admettait comme seul criterium de la valeur des lentilles tout simplement l'*angle d'ouverture* formé par deux rayons extrêmes (voir plus haut). Les indices de réfraction des milieux, qu'ils soient l'air, l'eau ou l'huile ne devaient pas entrer en ligne de compte.

Pour les partisans de l'*ouverture angulaire*, un objectif à sec d'un angle de 180° représentait la plus large ouverture possible que les *immersions* soit à l'eau, soit à l'huile ne pouvaient dépasser; en résumé, un faisceau lumineux, pour un même angle, était supposé avoir la même valeur, quant à l'ouverture, quel que fut l'indice de réfraction du milieu de l'objet rayonnant.

Voulant éviter toute confusion, les adeptes de la théorie de l'OUVERTURE NUMÉRIQUE (théorie d'Abbe) définissent tout d'abord l'ouverture, la capacité qu'a un objectif d'utiliser

le plus ou moins grand nombre de rayons qu'il reçoit (to the greater or less number of rays which are collected and utilized by an optical instrument) (1).

Ils sont ainsi parvenus à faire admettre que quand il s'agit d'un même milieu, l'ouverture doit être appréciée non par l'angle même, mais par le sinus de la moitié de l'angle. Ainsi deux objectifs à sec ayant des angles de 180° et 60° ne sont pas, quant à leur ouverture, dans le rapport 3 : 1, mais 2 : 1.

Quand les milieux sont différents, tenant toujours compte des sinus, un nouveau facteur doit intervenir : *l'indice de réfraction du milieu.*

Comme on le verra ci-après, n étant l'indice de réfraction, u la $\frac{1}{2}$ de l'angle d'ouverture, Abbe a établi la formule n sinus $u = a$ par laquelle il a déterminé l'ouverture numérique.

Nous allons essayer de résumer brièvement la théorie qui nous occupe, nous efforçant de la simplifier afin de la rendre facilement compréhensible.

Pour les lecteurs qui désireraient étudier cette intéressante question d'une façon approfondie, nous renvoyons aux sources originales que nous avons soin de faire connaître dans la bibliographie.

OBJECTIFS A SEC ET A IMMERSION.

Il importe dès maintenant que l'on ait une idée exacte de ce qu'il faut entendre par *objectif à immersion* et par *objectif à sec.*

(1) J. R. M. S. — Vol. 1, 1881, page 388.

Entre la lentille frontale d'un objectif à sec et l'objet à examiner, une *couche d'air* se trouve interposée. Mais si, entre l'objet à examiner et la lentille frontale du système, on interpose un liquide, l'indice de réfraction étant alors plus grand que celui de l'air, on aura un *objectif à immersion*. Le *milieu* employé pour unir ainsi l'objet au système peut être l'eau ou l'huile ; dans ce dernier cas, l'indice de réfraction étant voisin de celui du verre, on aura ce que l'on a appelé l'*immersion homogène*. Cependant, un système à immersion peut fonctionner comme un objectif à sec. En effet, supposons un objet, une diatomée, par exemple, *montée à sec* et examinée par un système à immersion à l'huile ou à l'eau ; une couche d'air existant entre l'objet et la lamelle, il est évident que cette dernière est devenue momentanément *la lentille frontale* de l'objectif ; ce sera un véritable système à sec, puisqu'il fonctionne comme tel d'après la définition donnée précédemment.

Quand l'objet est monté au baume ou dans un liquide très réfringent, de telle sorte qu'il n'existe pas d'air interposé entre l'objectif et l'objet, on a employé véritablement l'immersion.

On peut mettre expérimentalement en relief la supériorité de l'immersion. Sur une même lame de verre, on monte des diatomées, les unes à sec, les autres dans le baume. On peut passer ainsi facilement des unes aux autres en faisant simplement glisser la préparation.

En regardant dans le tube du microscope, l'oculaire étant enlevé, les diatomées montées dans le baume, on apercevra au centre un cercle lumineux, brillant : c'est la section du faisceau émergent de la lentille.

En faisant passer maintenant les diatomées montées à sec, le cercle lumineux sera beaucoup plus petit que dans le premier examen; il apparaîtra entouré d'une couronne obscure. On a ainsi la preuve certaine qu'un même objectif, dont les conditions restent exactement les mêmes, reçoit et utilise plus de rayons quand il est employé à immersion que s'il fonctionne à sec.

DES OBJECTIFS A SEC DE 180°, DE 82° DANS LE BAUME ET DE 126° DANS L'EAU ONT LA MÊME OUVERTURE.

Soit un objet quelconque placé sur une lame XJ (fig. 17) et examinée au microscope. Les rayons AD et A'D (1) faisant avec la normale un angle voisin de 41° prendront

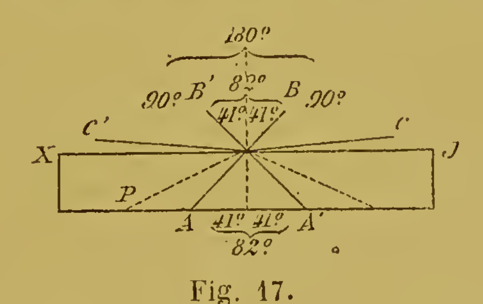


Fig. 17.

en émergeant dans l'air les directions *c*D et *c'*D dont l'angle avec la normale sera voisin de 90°; la section du cône lumineux *c*D*c'* s'étalera, comme le montre la figure, en produisant un angle voisin de 180°; pour recueillir tous les rayons de *c*D*c'*, il faudrait un objectif à sec dont l'angle serait 180°.

(1) Dans la figure, la lettre D n'a pas été reproduite; on verra sans peine qu'elle devrait se trouver à la rencontre des lignes AB et A'B'.

Mais en employant l'immersion homogène, un angle de 82° suffira pour recevoir tous les rayons provenant du cône ADA'. En effet, les rayons AD et A'D pénétreront en ligne droite suivant AB et AB' dans la lentille frontale de l'objectif sans réfraction aucune, puisque l'indice du liquide employé est sensiblement celui du verre; la lame XJ, le liquide immergeant la lentille frontale, tout cela forme un milieu homogène à travers lequel les rayons lumineux passent sans déviation.

Donc un objectif à immersion homogène de 82° recueille le même nombre de rayons qu'un système à sec de 180°; ces deux objectifs ont donc réellement la même ouverture.

Par le même raisonnement, on prouverait, puisque l'angle critique du verre à l'eau est de 48°, qu'un objectif à immersion à eau de 96° est capable de recevoir tous les rayons que recueillerait un objectif à sec de 180°.

Il suffit, d'ailleurs, pour s'en assurer, de jeter les yeux sur la figure 18.

L'angle limite du verre à l'eau étant 63°, un cône

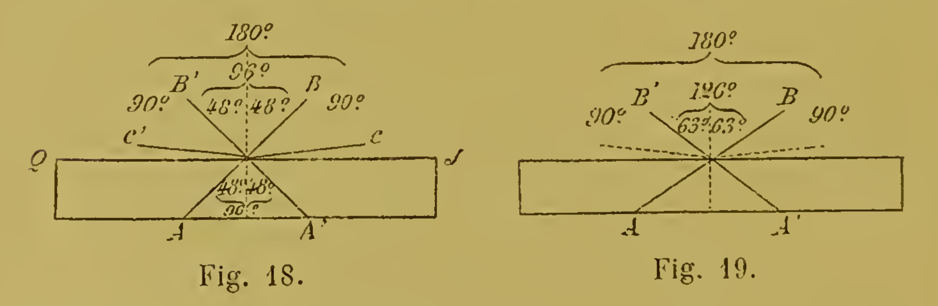


Fig. 18. Fig. 19.

de 126° (fig. 19) s'étalerait en émergeant dans l'eau suivant un angle cDc' voisin de 180°, il faudrait, pour recueillir tous les rayons du cône cDc', un objectif à eau de 180°. Les rayons au delà de Ac et Ac' ne seraient pas recueillis

par l'objectif à immersion à eau, car ils sont réfléchis totalement, puisqu'ils sont au delà de l'angle limite.

Un objectif à immersion homogène de 126° recueillerait tous les rayons du cône ADA′, puisque AD et A′D pénètrent dans l'objectif en ligne droite suivant ADB et AcB′; il en est ainsi parce que lame, liquide immergent et lentille frontale font un tout homogène à travers lequel il ne peut y avoir de réfraction.

En résumé, *nous avons établi que des objectifs de 180° à sec, 98° dans l'eau, 82° au baume reçoivent le même nombre de rayons, conséquemment, que ces différents systèmes ont une même ouverture. En outre, 126° au baume a la même ouverture que 180° à sec.*

Si des rayons (fig. 17) en émergeant dans l'air font avec la normale des angles EDP et FDP′ plus grand que 41° (angle limite du verre à l'air), on sait ce qu'ils deviendront; loin de se réfracter, ils se réfléchiront complètement à la surface de XJ, suivant la loi de la réflexion totale; ils n'entreront pas dans un objectif à sec quel que soit son angle d'ouverture.

Dans l'objectif à immersion homogène, dont le liquide immergent serait à indice équivalent à celui du verre, la réflexion totale est évidemment annulée.

DÉFINITION DE L'OUVERTURE.

L'illustre professeur d'Iéna, M. Abbe, qui, par ses travaux, a fait accomplir à l'optique du microscope des progrès immenses, a publié dans le *Journal de la Société royale de microscopie de Londres* un travail intitulé : *On the estima-*

tion of Aperture in de microscope. Pour continuer l'exposé de l'ouverture numérique, nous croyons faire chose utile en analysant et en résumant, de ce travail, quelques points qui intéressent surtout les débutants par la portée pratique des conclusions.

Si on considère la marche des rayons qui forment l'image dans un télescope, on voit qu'ils arrivent sensiblement parallèles entre eux; l'ouverture d'un objectif dans une telle lunette sera donc exprimée par le diamètre de cette lentille; cela est admis depuis longtemps. La question de l'ouverture présente là peu de difficulté.

Quand il s'agit d'une simple lentille de microscope, le nombre de rayons pénétrant suivant un plan méridien, grandit avec le diamètre, si toutes les circonstances restent les mêmes. La lentille projetant une image distincte à une certaine distance, cette distance sera bien plus grande comparée au diamètre de la lentille; ce sera toujours le cas dans le microscope; on aura donc à *la face supérieure émergente* de la lentille les mêmes circonstances qu'à la face frontale d'un objectif télescopique. On peut conclure de là que le plus ou moins grand nombre de rayons émergents *et par conséquent utilisés,* peut être mesuré par le diamètre, les autres circonstances restant les mêmes.

Si on tient maintenant compte de toutes les circonstances qui se présentent dans un objectif, quelques considérations nous montreront que pour une lentille simple *l'ouverture doit être exprimée par le rapport entre le diamètre absolu et la longueur focale.*

Soit deux lentilles L et L' ayant *même diamètre,* mais ayant des longueurs focales différentes, soit 2 et 1. Pour

des surfaces de l'image, à une distance définie, elles transmettront un même nombre de rayons, car si les instruments qui les portent devenaient des télescopes, elles transmettraient le même nombre de rayons si l'objet était substitué à l'image. Mais la longueur focale est différente; il s'ensuit que l'amplification des images est aussi différente; égales surfaces des images dans les deux cas ne correspondent pas à des aires égales de l'objet rayonnant. La lentille L admettra un plus grand nombre de rayons que L′, parce que, pour une plus petite partie de l'objet, celle-là admet plus de rayons que celle-ci.

Si L amplifie N diamètres, L′ amplifiera 2N. Ainsi, les rayons recueillis pour donner 1 *mmc* de champ de l'image proviennent d'une surface de l'objet $\frac{1}{N}$ *mmc* pour L, et $\frac{1}{2N}$ pour L′. La lentille L à plus grande amplification, dans cet exemple, admet deux fois plus de rayons que l'autre L', parce qu'elle admet le même nombre de rayons d'un champ ayant la moitié du diamètre que L′. En général, l'admission des rayons avec différentes longueurs focales (le diamètre d'ouverture restant le même) est en raison inverse de la longueur focale.

Dans une simple lentille, l'*ouverture* doit être déterminée par le rapport entre le diamètre d'ouverture et la longueur focale de la lentille. Dans le même ordre d'idée, on a ainsi la même chose que l'ouverture absolue du télescope.

Examinons maintenant un système composé; c'est le cas le plus important dans le microscope. L'ouverture actuelle, qui limite physiquement la transmission de la lumière à travers un système composé, varie suivant des circonstances

particulières : 1° elle peut être le bord de la lentille frontale; 2° de la lentille postérieure; 3° le diaphragme inséré dans une des parties du système.

Ainsi pour le même objcetif, le eône des rayons admis envoyé eontinuellement de l'objet rayonnant sur la lentille émergente (supérieure), il peut y avoir différentes ouvertures suivant les eireonstanees ei-dessus indiquées. Il ne peut être indiqué de la sorte une ouverture définie. On peut lever cette diffieulté en admettant eomme ouverture le diamètre du faisceau émergent ou, ce qui revient pratiquement au même, *le diamètre effectif* de la lentille supérieure.

Les faiseeaux émergents d'un objectif mieroscopique eonvergeant vers un foyer relativement distant, les rayons sont approximativement parallèles (voir dans la figure 12 la marehe des rayons); les conditions sont plus ou moins semblables à ee qui se passe dans le télescope du côté de l'objet (en renversant done les ehoses). Le diamètre du faiseeau émergent, soit qu'il émerge d'une simple lentille ou d'un système eomposé, doit toujours avoir la même signifieation.

L'influenee du pouvoir ou de la longueur focale reste ainsi la même que dans le eas d'une lentille simple. Un objeetif avee une longueur foeale égale à la moitié d'un autre admet avee la même *ouverture linéaire* (diamètre) deux fois plus de rayons que le premier, paree que l'amplifieation de l'image est doublée; le premier amplifiant deux fois plus que l'autre admet le même nombre de rayons pour un ehamp moitié moindre en diamètre. Il est bien entendu que le *milieu immergent* est le même dans les deux cas. Nous coneluons :

a) L'admission des rayons avec un même pouvoir ampli-

fiant ou longueur focale varie avec le *diamètre linéaire* du faisceau à son émergence.

b) Avec différents pouvoirs amplifiants, la même admission nécessite des ouvertures linéaires (diamètres) en rapport avec la longueur focale, et réciproquement l'admission par une même ouverture linéaire est en raison inverse de la longueur focale.

Par conséquent, l'ouverture d'un objectif est toujours représentée par le rapport entre l'ouverture linéaire au plan d'émergence (diamètre du faisceau émergent) et la longueur focale du système.

Jusqu'à ce moment, il n'y avait lieu que de comparer des objectifs employés dans le même milieu : l'air, l'eau ou l'huile.

DÉTERMINATION DE L'OUVERTURE NUMÉRIQUE.

$$(a = n \sin u)$$

Abbe et Helmholtz en 1873, tout à fait indépendamment, ont établi la relation qui existe entre les faisceaux des rayons admis dans un objectif et les faisceaux émergents. Voici cette proposition :

Soit o et o' (fig. 19) les foyers conjugués aplanatiques d'un système à grand angle; u, U les angles d'inclinaison de deux rayons admis; u', U' les angles de ces mêmes rayons à leur émergence; on aura toujours :

$$\text{Sin } U' : \sin u' = \sin U : \sin u$$

ou

$$\frac{\text{Sin } U'}{\text{Sin } U'} = \frac{\sin u'}{\sin u} = \text{constante} = c \ (1)$$

C'est-à-dire que les sinus des angles des rayons conjugués

des deux côtés d'un système aplanatique donnent toujours un et même quotient c.

Supposons, maintenant, que pour un objectif dans une

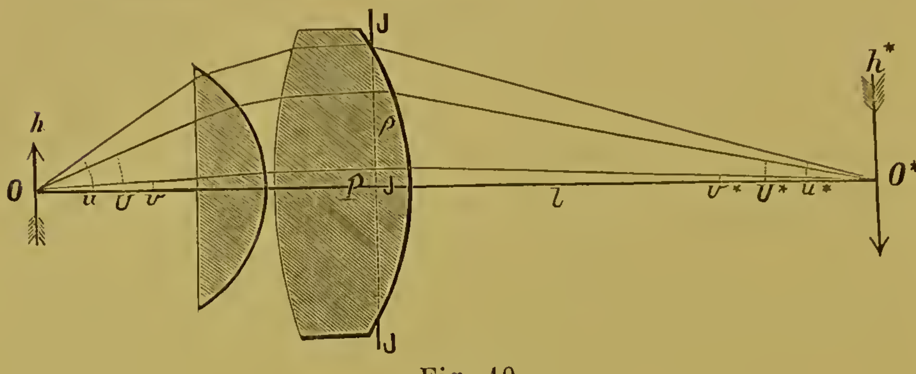


Fig. 19.

position particulière d'un foyer conjugué de l'objet et de l'image, la valeur de la constante c (formule 1) soit déterminée numériquement, il sera possible de calculer l'obliquité u' d'un rayon émergent par l'obliquité u d'un même rayon incident par le moyen de l'équation :

$$\text{Sin } u' = c \sin u \quad (2)$$

Cette équation est applicable au rayon le plus oblique qui est transmis à travers le système, u' exprime la moitié de l'angle du faisceau émergent, u sera la moitié de l'angle du faisceau incident ou le *demi-angle d'ouverture*.

L'ouverture linéaire d'un système, ou le diamètre du faisceau dans le plan de son émergence, est facilement calculée par le moyen de l'angle u' et la distance à laquelle l'image est projetée. Soit J le plan de l'émergence, l la distance PO de l'image à PJ; soit JP $= \rho$; ρ exprime la moitié du diamètre, par conséquent, la $\frac{1}{2}$ de l'ouverture linéaire du faisceau.

On a PJ = PO × tang u'; en effet, dans tout triangle reetangle, l'un des eôtés de l'angle droit est égal à la tangente multipliée par le eôté opposé.

L'équation préeédente devient :

$$\rho = l \text{ tang } u' \quad (3)$$

$$\text{Or tang } u' = \frac{\sin u'}{\cos u'}$$

En remplaçant dans (3) tang u' par sa valeur, on obtient :

$$\rho = \frac{l \sin u'}{\cos u'} \quad (4)$$

Dans le cas d'un objeetif microscopique, la distanee l (la longueur du tube) est toujours beaueoup plus grande que ρ ($\rho = \frac{1}{2}$ diamètre de la lentille émergente), l'angle u' de eonvergenee est done aussi très petit, et il mesure quelques degrés seulement; sans erreur appréeiable, le eosinus de l'angle peut être regardé eomme étant égal à 1, et prenant cette valeur pour l'introduire dans l'équation (4), nous avons :

$$\rho = l \sin u'.$$

Remplaçant dans eette égalité sin u' par sa valeur c sin u trouvée ei-haut, nous avons :

$$\rho = l\, c \sin u \quad (5).$$

Nous obtenons ainsi l'expression de la moitié de l'ouverture linéaire du système en fonction du sinus de la moitié de l'angle d'ouverture.

La question à résoudre maintenant est celle-ei : quelle est la valeur de c ?

En nous servant de la loi de convergenee d'un faisceau

infiniment étroit de Lagrange-Helmholtz, nous pourrons donner une autre forme à l'équation (5).

Si o et o' expriment les foyers conjugués;

h le diamètre d'un objet correspondant à o;

o' le diamètre de son image correspondant à o';

n et n' les indices de réfraction du milieu de la lentille frontale et de la lentille émergente;

v et v' les angles d'obliquité d'un rayon traversant le système très-près de l'axe, on a :

$$\frac{u}{u'} = \frac{n}{n'} \times \frac{h}{h'} \text{ ou } \frac{n}{n'} \times \frac{\text{I}}{\text{N}} \text{ (6).}$$

N exprime l'amplification linéaire d'un système par pair de foyers conjugués (1); cette proposition est vraie pour chaque composition d'un système et pour chaque position d'un foyer conjugué.

Par cette proposition, on voit que le rapport entre les angles très petits v et v' d'un rayon à son incidence et à son émergence peut être déterminé *par l'indice de réfraction du milieu rayonnant*, *l'image* et *l'amplification linéaire*, sans autre élément du système optique, telle que la position des foyers. Mais, dans un système aplanatique, les rayons ont une obliquité u et u' infiniment petite; or, dans le cas de très petits angles, le rapport des sinus devient identique au rapport des angles, de sorte qu'on a $\frac{\sin u'}{\sin u} = \frac{u'}{u}$. La constante $c = \frac{\sin u'}{\sin u}$ est aussi égale à $\frac{u'}{u}$; or, $\frac{v'}{v} = \frac{n}{n'} \cdot \frac{\text{I}}{\text{N}}$ donc

$$c = \frac{n}{n'} \cdot \frac{\text{I}}{\text{N}}$$

(1) Physiologische Optik, 1866 (Helmholtz). Mém. Acad. Berlin, 1803 (Lagrange).

Introduisant cette nouvelle valeur de c dans (5), on a :

$$\rho = \frac{l}{n'} \cdot \frac{n}{N} \sin u.$$

$n' = 1$ dans le cas du microscope, puisque les rayons émergeant toujours dans l'air, l'équation devient :

$$\rho = \frac{l}{N} . n \sin u.$$

Soit a égal à $n \sin u$, nous aurons :

$$\rho = \frac{l}{N} a. \ (7).$$

On sait que si un objectif a une longueur focale $= f$ et que si l'image est projetée à une distance $= l$ de la lentille, l'amplification N peut être approximativement trouvée par la formule $N = \frac{l}{f}$. (Voir page 20.)

On peut en obtenir :

$$\frac{l}{N} = f.$$

Dans l'équation (7), remplaçons $\frac{l}{N}$ par sa valeur f, on obtient :

$$\rho = f\,(n \sin u)$$

ou

$$\frac{\rho}{f} = n \sin u = a.$$

Or $\frac{\rho}{f}$, c'est le rapport de la moitié de l'ouverture linéaire (moitié du diamètre) à la longueur focale; ce rapport est égal à n sin u.

Le rapport de la moitié de l'ouverture linéaire (diamètre) d'un système à la longueur focale est exprimé par a ou par l'ouverture numérique. La valeur n sin u est l'équivalent d'ouverture en fonction du sinus de la moitié de l'angle d'ouverture et de l'indice du milieu dans lequel l'objet rayonnant est placé.

La démonstration qui précède, que nous avons développée

pour la rendre plus facilement compréhensible, est empruntée à l'un des travaux d'Abbe; il en a déjà été question dans l'exposé de cette théorie. Il se peut que certains lecteurs la trouvent longue; si les raisonnements sont laissés de côté, la formule, à notre avis, doit être connue de tous ceux qui manient le microscope; il en est de même des conclusions que l'auteur en a tirées et que nous allons passer rapidement en revue :

1° *a)* Il existe un rapport entre l'ouverture linéaire (diamètre efficace) et la longueur focale d'un système.

b) Ce rapport est entièrement indépendant de la composition et de l'arrangement du système.

c) Il est seulement déterminé par l'équivalent d'ouverture $n \sin u$.

2° L'angle seul ne peut servir à apprécier un système; l'ouverture doit être appréciée en fonction de l'angle et de l'indice de réfraction.

3° Avec un et même milieu du corps rayonnant, l'ouverture n'augmente pas avec l'angle, mais avec le sinus de la moitié de l'angle (ou avec la corde de tout l'angle). Ainsi, deux systèmes de 60° et 180° ne sont pas entre eux comme 1 : 3, mais 1 : 2 seulement.

4° Les angles égaux du faisceau admis ne donnent pas des ouvertures égales quand les milieux sont différents; mais des systèmes employant de tels angles sont entre eux comme les indices de réfraction.

Il nous est maintenant facile de vérifier ce que nous avons déjà démontré plus haut, savoir : que des objectifs de 82° homogène immersion, 97° à eau et 180° dans l'air ont la même ouverture, en d'autres termes, que de tels objectifs

ont même ouverture et, par conséquent, utilisent le même nombre de rayons. Ils sont donc également résolvants.

Remplaçant dans la formule $a = n \sin u$ les lettres par des nombres, pour les trois cas énoncés ci-haut, on aura :

Objectif à sec de 180°, $a = 1 \times \sin \frac{180}{2} = 1$; $\sin 90 = 1 \times 1 = 1$.

Objectif à eau de 97°, $n = 133$; $a = \sin \frac{97^\circ}{2} \times 133 = 1$;

Objectif homogène de 82°, 17″; $a = \sin \frac{82^\circ\ 17^\circ}{2} \times 152 = 1$;

$$1 \times \sin \frac{180}{2} = \sin \frac{97^\circ\ 11}{2} \times 133 = \sin \frac{82^\circ\ 17}{2} \times 152 = 1.$$

EXPLICATION DE LA TABLE DE STEPHENSON.

Nous verrons plus loin qu'Abbe a établi une règle qui permet de calculer le pouvoir résolvant quand l'angle d'ouverture est connu ; dans la lumière oblique, il a trouvé que le nombre de lignes qui peuvent être résolues par pouce est égal à deux fois le nombre d'ondulations par pouce multiplié par le sinus de la moitié de l'angle d'ouverture. C'est d'après cette formule que les nombres de la 6e colonne de la table de Stephenson ont été calculés; on a pris comme longueur d'onde (voir page 66) la valeur de l'onde dans la bande E du spectre, où elle est égale à 0,5269 μ. La bande E se trouve entre le jaune et le vert dans le spectre (page 66). Il est évident que si l'on prenait d'autres bandes, on obtiendrait des nombres différents. Ainsi la résolution pour un même objectif varie avec la nature de la lumière, la couleur des objets examinés, etc. Comme le fait remarquer Stephenson, en prenant la ligne D (entre le

rouge et l'orangé) ($\lambda = 0,5889\ \mu$), le pouvoir résolvant sera 10 1/2 p. c. moindre que ce qu'indique la table ; avec la ligne F (entre le vert et le bleu) ($\lambda = 0,4861\ \mu$), le pouvoir résolvant serait 8.4 p. c. plus grand. En prenant la ligne $\lambda = 0,40\ \mu$ (voisine H_1) (ultra violet) pour des résolutions photographiques, si elle est suffisante, ce qui est probable, on résoudrait avec un objectif à sec 127,000 lignes par pouce, par l'immersion à eau, 168,910, par l'immersion homogène, 193,040 ; on peut même faire l'hypothèse qu'avec une lamelle convenable, on atteindrait le nombre 200,000.

Dans cette supposition, l'espace entre les lignes serait de $\frac{1}{400,000}$ de pouce.

Il est bien entendu que les objets doivent être montés dans le baume, s'il s'agit de l'homogène immersion ; dans l'eau, s'il s'agit de l'immersion à l'eau ; on a vu, en effet, plus haut qu'un objectif à immersion fonctionnait comme un objectif à sec d'une grande ouverture, si l'on examinait un objet monté à sec.

THÉORIE DE LA FORMATION DES IMAGES MICROSCOPIQUES, D'APRÈS ABBE.

BIBLIOGRAPHIE. — *Arch. Mikr. Anat. IX*, 1873 (mémoire original d'Abbe).

Procedings of the Bristol naturalists' Society, 1875. (Traduction par Fripp.)

The Monthly microsp. journal, vol. XVI, p. 36 (Helmholtz).

STEPHENSON. — Même journal, vol. XVII.

Journal of de R. M. S., août 1879, p. 650.

CRISP. — *On the Influence of Diffraction in microscopique vision* — *Journal Quek. Micr. Club*, 1878.

Crisp. — *Notes on Aperture, Microscopical Vision, etc*, *R. M. S*, 1881, p. 303.
Nageli et Schwendener. — *Das Mikroscop.*

Il y a quelques années déjà, le professeur Abbe, d'Iéna, a exposé une théorie de la vision microscopique qui eut en Allemagne, en Angleterre et en Amérique un grand retentissement. Les idées admises jusqu'à ce jour sur la formation des images dans le microscope se trouvaient tout à coup renversées sans que rien ne le fît prévoir; M. Crisp, qui en a donné un aperçu dans le *Journal of the royal microscopical Society*, n'hésite pas à dire que cette découverte est pour l'optique tout aussi importante que celle du téléphone pour l'électricité et du spectroscope pour la chimie.

Nous pensons qu'un aperçu rapide de cette théorie si féconde en résultats pratiques serait utile aux futurs microscopistes; nous donnerons, d'abord, un exposé succinct des phénomènes de diffraction et d'interférence nécessaires à l'intelligence des expériences du professeur d'Iéna, et cela pour éviter aux lecteurs des recherches plus ou moins pénibles dans les traités de physique.

INTERFÉRENCE (1).

Pour expliquer les phénomènes produits par la lumière, les physiciens modernes adoptent l'hypothèse des ondulations; ils admettent que les molécules des corps lumineux sont animées d'un mouvement particulier, se communiquant

(1) *Leçons d'optique physique*, par Verdet, p. 72.
Cours de physique professé à l'École polytechnique, par Verdet, t. II, p. 304.

à ce fluide — *l'éther* — répandu partout dans la nature, occupant les espaces interplanétaires comme les espaces intermoléculaires. Comme l'air propage les vibrations des corps sonores dans les phénomènes du son, de même, l'éther propage les vibrations lumineuses avec une vitesse bien plus grande encore et évaluée à 75,000 lieues à la seconde.

L'éther est éminemment élastique, *sa densité varie suivant les différents milieux. — L'amplitude des vibrations de l'éther produit l'intensité de la lumière; les couleurs sont le résultat de la rapidité plus ou moins grande de ces mêmes vibrations.*

En comparant aux ondes sonores les ondes lumineuses, on concevra ces dernières. Que l'on remue une corde par l'un des bouts, le mouvement se transmettant en serpentant jusqu'à l'autre extrémité donnera une idée des vibrations lumineuses : la propagation a lieu dans le sens de la corde, mais les vibrations ont lieu en travers.

On entend par longueur d'ondulation λ, l'espace comprenant l'aller et le retour d'une molécule d'éther vibrant sous l'impulsion d'un rayon lumineux ; l'aller ou le retour seul constitue une demi-ondulation $\lambda/2$.

Si une première molécule *a* est ébranlée, elle communiquera son mouvement à une seconde *b*, puis à une troisième *c*, etc.; mais *b* ne sera ébranlée qu'après *a* ; et *a* reviendra vers sa position première lorsque *b* oscillera encore dans le sens primitif.

Soit maintenant deux rayons RRR et PPP (fig. 20) ayant même longueur d'ondulation et suivant sensiblement la même route ; λ représente une longueur complète d'ondulation comprenant l'aller et le retour d'une molécule.

Il est évident que si les vibrations des deux rayons lumineux coïncident, leurs intensités s'ajouteront; si l'un des

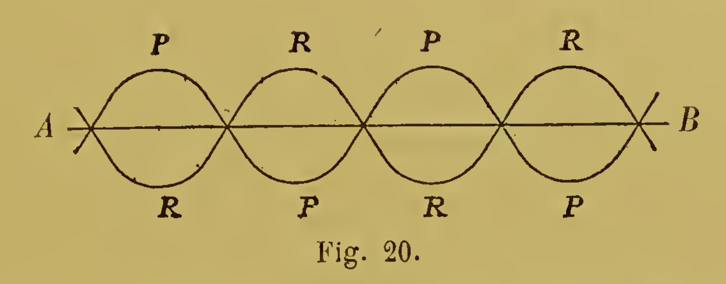


Fig. 20.

rayons est en avance ou en retard d'un nombre pair de 1/2 ondulations ($\lambda/2$), les deux rayons se renforceront mutuellement et il en résultera que la lumière sera ainsi elle-même renforcée. Mais supposons maintenant que par une cause quelconque, l'un des rayons soit en retard sur l'autre exactement d'une demi-longueur d'onde ($\lambda/2$); la même molécule d'éther recevant alors au même moment deux impulsions égales, et de sens contraire, entrera nécessairement en repos; il en résultera de l'obscurité. Quand il y aura retard d'un rayon l'un sur l'autre d'un nombre impair de fois 1/2 λ, il y aura encore obscurité.

Supposons deux traits ou mieux deux points lumineux L et L′ (fig. 21), donnant une lumière simple, le rouge, par exemple, et communiquant à l'éther des ondulations égales; ces deux points sont très rapprochés l'un de l'autre.

Les ondulations qu'ils produiront formeront deux séries de sphères dont les rayons sont supposés différant l'un de l'autre de 1/2 λ.

Les arcs X, Y, Z, U, V, W, R, P représentent les intersections de ces sphères par le plan de la figure.

Deux arcs consécutifs et parallèles, l'un au trait, l'autre

en pointillé, sont séparés par 1/2 λ; deux arcs de même espèce, soit au trait, soit en pointillé, sont séparés par une longueur d'ondulation λ.

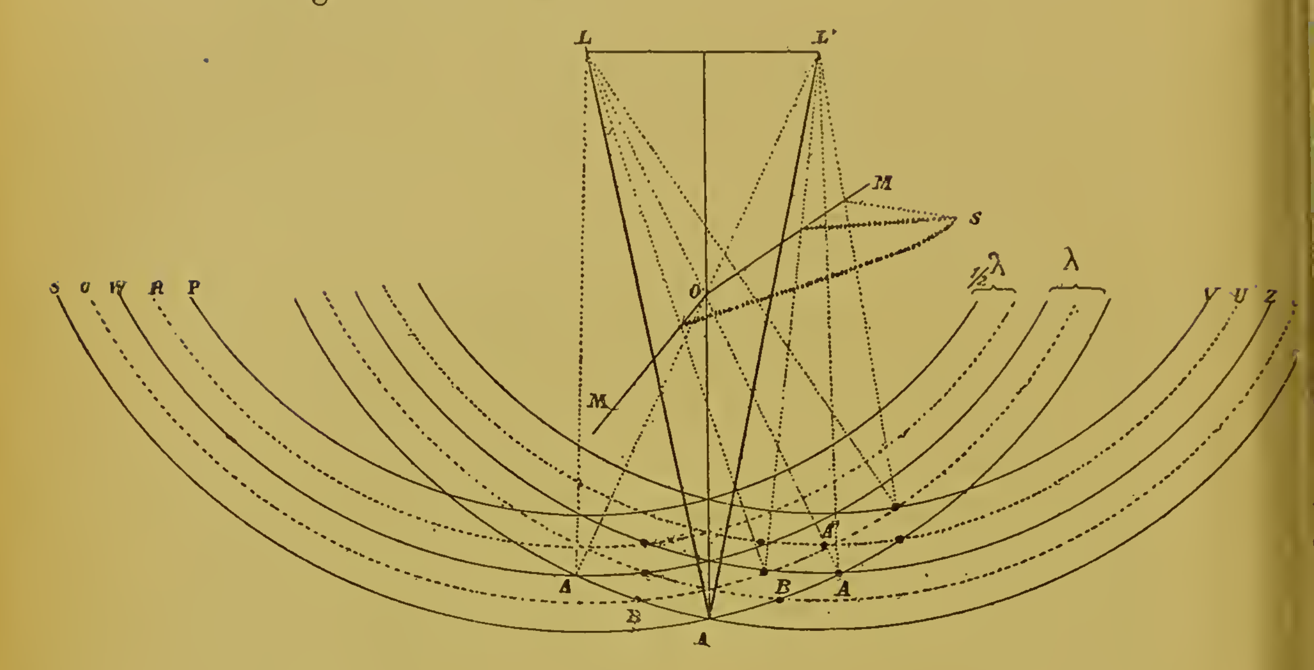


Fig. 21.

Supposons que sur les arcs figurés en trait, les molécules éthérées soient animées de la plus grande vitesse dans un sens, et que sur les arcs ponctués, les molécules soient animées du plus grand mouvement en sens inverse; il est évident que là où les arcs ponctués couperont les arcs pleins, il y aura discordance complète; les molécules se choquant, animées d'une même vitesse et de direction contraire, entreront en repos; il se formera en ces endroits des bandes noires. Mais il se formera des bandes brillantes là où les arcs de cercles de même espèce se couperont.

Ainsi les rayons lumineux LA et L'A, par exemple, ayant même longueur et même intensité, se rencontrant au point A (intersection de deux arcs pleins) produiront une bande brillante parce que l'intensité de ces deux rayons s'ajoutera.

En A', où se rencontrent deux arcs dessinés en pointillés, l'intensité des rayons sera aussi renforcée; il en sera de même en A''; là encore, il se formera des bandes brillantes. Mais en B la différence des rayons LB et L'B étant 1/2 λ, l'impulsion à l'éther étant de même force et de direction contraire, il y aura repos des molécules choquées, et, par conséquent, il en résultera de l'obscurité; là se formera une bande obscure.

Sur un écran placé en A, on verra projetée une série de bandes alternativement lumineuses et obscures que l'on a appelées *franges* (fig. 22).

En interceptant les rayons d'une des sources lumineuses,

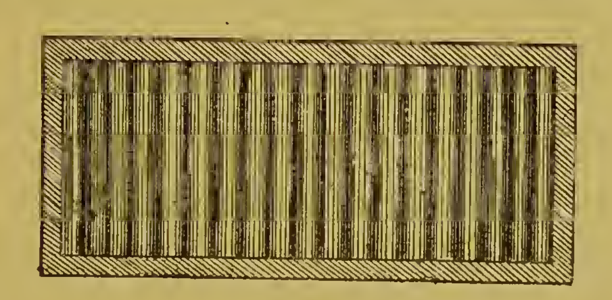


Fig. 22.

soit L', soit L'', il ne se formera plus de franges; c'est ce qui a fait dire que de *la lumière ajoutée à de la lumière peut produire de l'obscurité* (1).

(1) Dans la figure 21, la grandeur des ondulations lumineuses a été énormément exagérée pour rendre la figure compréhensible; l'angle LAL' doit être considéré comme étant très petit.

Grimaldi faisait pénétrer une lumière simple dans une chambre obscure par deux fentes très étroites L et L′ ; il recevait les franges sur un écran.

Fresnel recevait sur deux miroirs MO et M′O faisant entre eux un angle très obtus, voisin de 180° des rayons de lumière simple, le rouge, par exemple, qu'il concentrait à l'aide d'une lentille hémisphérique à court foyer ; cette disposition peut facilement être ramenée à celle que nous avons supposée plus haut donnant deux rayons L et L′ ; les rayons partant du point S et se réfléchissant peuvent être considérés comme arrivant des deux points L et L′.

Le même auteur, au lieu de recevoir les franges sur un écran, les observait avec une loupe, véritable micromètre, construit de façon à pouvoir prendre les longueurs des différentes franges.

Par le calcul, on a pu mesurer la longueur d'ondulation :

LAL′ étant ω, on a trouvé que $\lambda = AA' \sin. \omega$. Par des mesures, on connaîtra LAL′ ou ω, ainsi que AA′.

La grandeur des franges variant d'une couleur à l'autre, les longueurs des ondulations varient de même comme l'indique le tableau suivant :

RAIES ET COULEURS	λ *mm*	RAIES ET COULEURS	λ *mm*
Raie B	0.000,688	Vert moyen . . .	0.000,512
Raie C	0.000,656	Raie F	0.000,484
Rouge moyen. . .	0.000,620	Bleu moyen . . .	0.000,475
Raie D	0.000,589	Indigo moyen. . .	0.000,449
Orangé moyen . .	0.000,583	Raie G	0.000,429
Jaune moyen . . .	0.000,551	Violet moyen . . .	0.000,423
Raie E	0.000,526	Raie H	0.000,393

Les phénomènes que nous venons de passer rapidement en revue constituent ce que Thomas Joung a appelé *interférence*.

DIFFRACTION (1).

Dans une chambre noire pénètre un faisceau lumineux (fig. 23) ayant traversé d'abord un verre coloré V de façon à produire une lumière simple, puis une lentille à court foyer, très convergente.

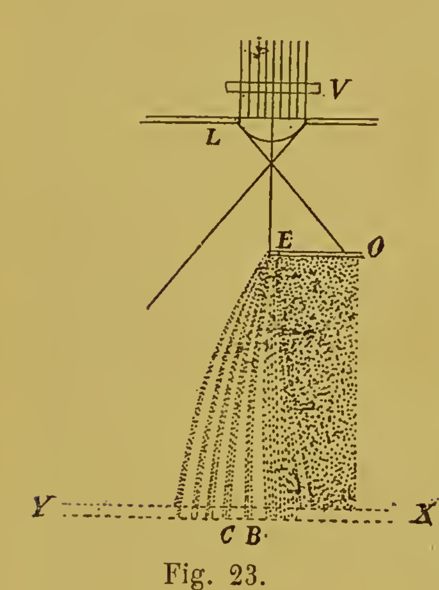


Fig. 23.

Le faisceau rase le bord mince E d'un écran O ; à une certaine distance, on le reçoit sur un autre écran XY ; on verra sur ce dernier une lumière faible pénétrer vers X et assez avant dans l'ombre produite par l'écran E ; vers Y se montrera la frange brillante B plus rapprochée de l'ombre géométrique ; c'est la frange de premier ordre ; à côté, apparaîtra une frange sombre C ; on pourra voir jusqu'à sept franges distinctes sombres ou brillantes parallèles entre elles et au bord de l'écran.

Les différentes couleurs du spectre donnent lieu à des franges ; *celles-ci sont d'autant plus étroites que la couleur*

(1) *Cours de physique*, par E. Verdet, t. II, p. 349.
Leçons d'optique physique, par E. Verdet, t. Ier, p. 248.
On trouvera dans ces ouvrages la bibliographie complète de l'interférence et de la diffraction.

spectrale qui lui a donné naissance est plus réfrangible. Si donc on fait pénétrer un rayon de lumière blanche dans la chambre obscure comme il est indiqué plus haut, mais en supprimant le verre coloré V, *les franges de chaque couleur seront séparées à cause de leur inégalité,* la lumière sera ainsi décomposée par *diffraction* et l'on apercevra sur l'écran récepteur des franges irisées.

Les spectres ainsi obtenus auront le rouge en dehors et le violet en dedans.

Si au lieu de placer un corps opaque E entre L et l'écran F, on place un corps très étroit en fil E' (fig. 24) ou un cheveu, des franges alternatives obscures et lumineuses se produiront encore; dans l'ombre même du cheveu, il se formera des bandes obscures et lumineuses : on aura ainsi des franges extérieures et intérieures.

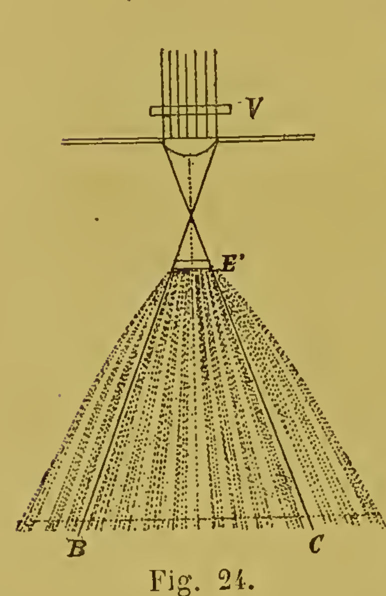


Fig. 24.

Les mêmes phénomènes de diffraction se produiront encore : 1° par deux fentes très étroites et très rapprochées (voir interférence); 2° par une fente très étroite; 3° par des trous circulaires ou rectangulaires, véritables diaphragmes.

Les phénomènes de diffraction étudiés primitivement par Grimaldi ont été expliqués par Fresnel, par le principe de l'interférence.

Réseaux. — Une série d'espaces alternativement transpa-

rents et opaques excessivement rapprochés et régulièrement distribués, constitue ce que l'on a appelé *réseau* en optique.

La lumière traversant un réseau produit des phénomènes de diffraction des plus remarquables, découverts par Fraunhofer. Pour produire un réseau, on peut attaquer par l'acide fluorhydrique une lame de verre recouverte, au préalable, d'une couche de vernis dans lequel on aurait tracé des lignes parallèles; 40 divisions par millimètre suffisent pour obtenir les effets de diffraction.

On aura une idée générale de l'effet produit par la lumière traversant un réseau, en appliquant ce dernier à l'ouverture d'une chambre noire; sur un carton blanc (fig. 25), placé



Fig. 25.

vis-à-vis et parallèlement au réseau, on apercevra au centre une image I blanche de la fente; vient ensuite de chaque côté un espace noir A, puis un spectre S ayant le violet en dedans et le rouge en dehors; on remarquera encore un nouvel espace noir A, auquel fait suite un spectre, etc. Le tout se répétera deux fois et symétriquement à l'image blanche de la fente.

Le test plaque d'Abbe et le test de diffraction du même auteur sont deux excellents réseaux: en regardant la flamme d'une bougie à travers les couvre-objets argentés et rayés qui constituent ces deux tests, on verra, au centre, l'image d'une flamme blanche; et symétriquement disposées de

chaque côté, des images irisées, ayant le rouge en dehors et le violet en dedans; les spectres seront d'une grande pureté.

En regardant une flamme à travers une lame de verre rayée de lignes très rapprochées, on verrait encore les mêmes phénomènes se produire. En rapprochant les paupières, on a devant l'œil un véritable réseau formé par les cils; en regardant alors une bougie, on verra une lueur horizontale due aux rayons diffractés; souvent même, on découvrira des spectres assez nets.

Fraunhofer a formé des réseaux à mailles carrées à l'aide de deux séries de lignes parallèles qu'il plaçait perpendiculairement l'une à l'autre; il s'est servi, à cet effet, de mousseline, de ruban ou d'étoffe tamisant en quelque sorte la lumière.

Il a confectionné aussi des réseaux à mailles irrégulières.

En plaçant devant une lampe, à une certaine distance de l'œil, un test de *Pleurosigma angulatum*, on apercevra une couleur violette d'abord; puis, en descendant cet objet à des distances successives, on verra apparaître la suite des couleurs spectrales; les Pleurosigma forment autant de réseaux qu'il y a d'individus sur la plaque.

La lumière se réfléchissant sur des stries alternativement polies et ternes produit des couleurs irisées; c'est ainsi que la nacre paraît irisée. L'industrie s'est même emparée de cette loi de la diffraction pour produire des boutons en métal qui donnent des effets d'irisation par diffraction.

Le test d'Abbe produit des phénomènes de diffraction par réflection; il suffit de l'examiner de façon qu'il réfléchisse la lumière vers l'œil.

EXPÉRIENCES D'ABBE.

Les expériences sur lesquelles Abbe appuie sa théorie sont des plus ingénieuses. Elles nécessitent un test de diffraction imaginé par cet auteur, ainsi qu'une série de diaphragmes se plaçant dans l'entonnoir de l'objectif; c'est le *aa* de Zeiss qui est recommandé pour les observations; avec le *a*3 du même constructeur, nous avons obtenu des résultats moins satisfaisants, peut-être, mais encore très décisifs; nous pensons qu'on employerait également bien des objectifs faibles grossissant de 40 à 60 fois; ceci dit pour les personnes désireuses de vérifier les expériences qui nous occupent, sans faire la dépense d'un nouvel objectif qu'elles trouveraient superflu. Quand cela sera possible, il vaudra toujours mieux se servir du *aa* dont il s'agit plus haut, spécialement construit pour les démonstrations que nous allons passer en revue.

L'objectif n'est pas vissé directement au tube, mais il y est adapté par l'intermédiaire d'un ajutage qui permet la rotation de l'objectif sur lui-même, tout en restant exactement dans l'axe de l'appareil. Cette disposition peut être rendue inutile en tournant le tube entier sur lui-même dans son coulant.

Test de diffraction. — Abbe construit son test de diffraction à l'aide de lamelles circulaires dont l'une des faces est argentée et adhérente à une lame. Nous décrirons ces lames à mesure qu'elles seront nécessaires aux démonstrations qui vont suivre. Disons dès maintenant que sur la mince couche métallique de l'une d'elles, on a tracé au diamant et en se servant de la machine à diviser, d'une part, un réseau A

(fig. 26) comprenant 70 lignes parallèles environ par milli-

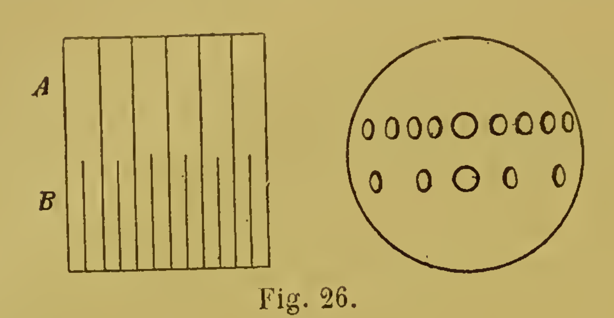


Fig. 26.

mètre, et, d'autre part, un autre réseau à 140 lignes par millimètre; la figure montre d'ailleurs les rapports entre les différentes lignes. Nous avons dit que le treillis ainsi construit formait un réseau; en effet, nous avons, d'après la définition donnée plus haut (voir *diffraction*), des espaces alternativement transparents et opaques formant des fentes très étroites. En regardant une bougie à travers ce réseau, on obtient, nous l'avons déjà dit, des effets de diffraction. Quand on examine maintenant au microscope la partie du test que nous venons de décrire, en se servant d'un oculaire et d'un objectif faible (de préférence *aa* de Zeiss), en ayant soin de placer le plus bas possible *un diaphragme cylindrique à faible ouverture, sous la table, dans la pièce* à ce destiné, en mettant au point, on apercevra les lignes des deux réseaux.

1re *expérience.* — Mais si on enlève l'oculaire, on observera (en regardant dans le tube ainsi dégarni, et examinant le réseau A) au centre du champ une image circulaire de l'ouverture du diaphragme (voir page 69, réseau); cette image est produite par les rayons du centre, les rayons dioptriques ordinaires, non diffractés; latéralement se pla-

ceront de chaque côté *et dans une position perpendiculaire aux lignes du test,* des images qui, dans la lumière homogène, apparaîtront très semblables à l'image centrale; ces images seront au nombre de quatre de chaque côté.

Dans la lumière blanche, elles seront irisées et présenteront à considérer des spectres dont les différentes couleurs seront d'une grande pureté : *le rouge sera en dehors, vers la périphérie du champ ;* le violet sera en dedans, par conséquent vers le centre. Ces images et ces spectres sont évidemment produits par des rayons diffractés. (Comparez cette expérience avec celle décrite page 69.)

Si l'on examine maintenant le réseau B, formé de 140 traits par millimètre, toujours sans se servir d'oculaire, au lieu de quatre images diffractées ou de quatre spectres de chaque côté, on n'en découvrira plus que deux, présentant d'ailleurs les mêmes phénomènes que s'il s'agissait du réseau A.

Nous pouvons donc conclure que le réseau contenant deux fois plus de lignes donne deux fois moins d'images ou de spectres de diffraction (images secondaires); la distance séparant ces dernières est en raison inverse de la distance entre les lignes du réseau.

Ordinairement, on enlève l'oculaire pour faire cette expérience; mais cela n'est pas nécessaire; en descendant le tube, on peut voir les spectres de diffraction en conservant l'oculaire (nous ne savons si ce fait a déjà été signalé); on rencontrera un point où les spectres se montreront fort bien avec toutes leurs propriétés.

Si les bords du diaphragme se trouvent altérés par quelque poussière, l'image centrale offrira une échancrure représen-

tant ces poussières; les spectres (ou les images secondaires) seront affectés de la même échancrure.

2e *expérience*. — Plaçons maintenant dans l'entonnoir de l'objectif un diaphragme dont l'ouverture a la forme d'un

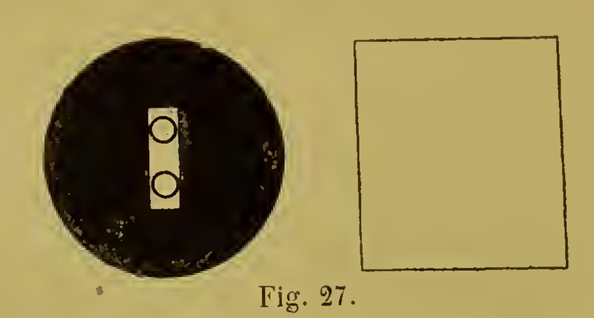


Fig. 27.

rectangle (fig. 27), d'un millimètre environ de largeur et une longueur de six mm., les bords de ce diaphragme étant parallèles aux lignes du réseau, examinons sans oculaire et nous voyons que les faisceaux de lumière centrale pénètrent seuls; les rayons de diffraction sont ainsi exclus; replaçons l'oculaire, et à notre grand étonnement plus une seule ligne du réseau n'est visible; nous ne voyons plus qu'une bande uniforme blanche, comme si l'argent n'avait pas été rayé; tournant l'objectif sur lui-même par l'intermédiaire de l'ajutage et amenant le diaphragme dans une position perpendiculaire aux lignes, en admettant ainsi les rayons diffractés, nous voyons de nouveau apparaître les lignes très nettement.

En se servant d'un diaphragme de même forme, mais ayant 2 mm. de largeur (fig. 28), les lignes du réseau A seront encore visibles; celles du réseau B ne le seront pas; ce dernier réseau apparaîtra comme une bande uniformément brillante.

Les lignes du réseau A sont visibles parce que, comme le

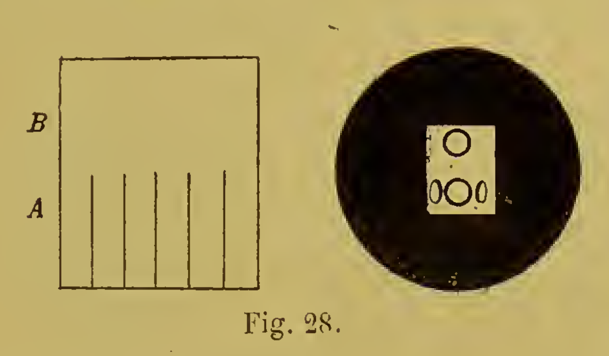


Fig. 28.

montre la figure 28, les deux premiers spectres de chaque côté de l'image centrale sont admis.

Les lignes du réseau B sont invisibles parce qu'aucun rayon de diffraction n'est admis. En faisant tourner l'ajutage de façon à amener les bords du diaphragme dans une position perpendiculaire aux lignes, celles-ci apparaîtront dans les deux parties du double réseau ; c'est qu'alors les rayons de diffraction sont admis à former l'image en se fusionnant avec les rayons centraux.

Par ces expériences, nous voyons qu'en plaçant des diaphragmes de plus en plus étroits dans l'entonnoir de l'objectif et en diminuant ainsi l'angle d'ouverture nous diminuons le pouvoir résolvant du microscope; et il est suffisamment démontré que cette diminution de ce pouvoir est due à l'exclusion des rayons de diffraction. Nous voyons que l'admission des faisceaux est liée à *la valeur de l'angle d'ouverture et qu'aucune résolution n'est possible si deux faisceaux diffractés ne sont admis*. En dernière analyse, nous pouvons dire que *le pouvoir résolvant est une fonction de l'angle d'ouverture.*

Le professeur Abbe a fixé une règle qui détermine le

nombre de lignes par millimètre qu'il est possible de résoudre dans la lumière oblique. Nous nous occuperons plus loin de cette question.

3e *expérience.* — Mais voici une expérience bien faite pour donner à réfléchir à ceux qui se servent du microscope :

On place un diaphragme muni de trois fentes rectangu-

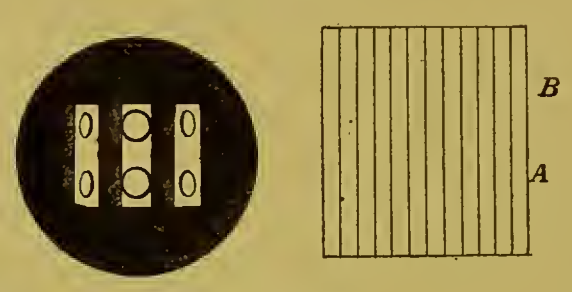


Fig. 29.

laires, que l'on dispose parallèlement au réseau (fig. 29). Le second spectre du réseau A et le premier du réseau B sont admis ainsi que le faisceau central ; on s'en assure en examinant sans oculaire ; replaçant ce dernier, on est fort surpris de voir que le réseau A contient autant de lignes que le réseau B ; *il se fait ainsi que les images des deux réseaux apparaissent* IDENTIQUES *quoiqu'elles soient en réalité* DIFFÉRENTES ; l'illusion est d'autant plus complète que les lignes fictives paraissent en continuation avec celles du réseau B ; en amenant les fentes du diaphragme dans une position perpendiculaire aux lignes en faisant tourner l'objectif, l'image réelle des deux réseaux apparaît comme elle existe réellement.

En ne permettant le passage, par un diaphragme ana-

logue, que du 4[e] spectre de A et du 3[e] de B, les lignes de ce dernier réseau paraissent doublées en nombre tandis que

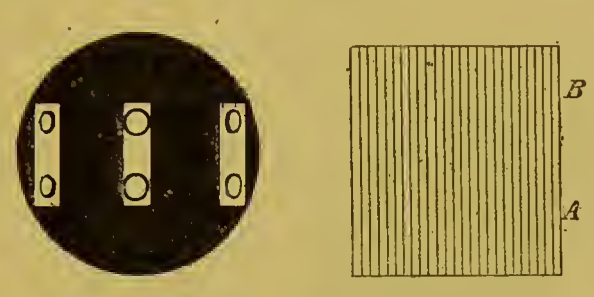


Fig. 30.

celles de l'autre réseau semblent avoir quatre fois plus de lignes (fig. 30).

4[e] *expérience.* — Les autres expériences que nous allons décrire sont faites avec un réseau croisé, obtenu en rayant un couvre-objet argenté comme précédemment; mais sur la lame de verre recouverte d'une mince couche du même métal on a tracé également un réseau ; l'orientation des deux espèces de traits ainsi obtenus est telle qu'ils se croisent

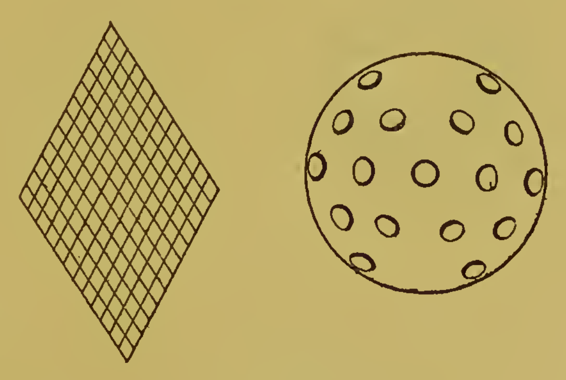


Fig. 31.

sous un angle de 60°; le tout est cimenté par le baume; en

examinant au microscope, on aperçoit un réseau formé de losanges comme le montre la figure 31. En enlevant l'oculaire, on verra les images diffractées comme la figure 31.

Avec un diaphragme rectangulaire, ainsi que le montre la

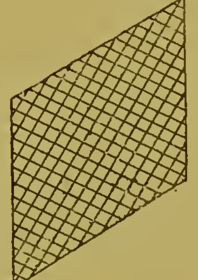


Fig. 32.

figure 32, amené dans une position parallèle à une espèce de diagonales des losanges, on ne verra plus qu'une série de lignes parallèles disposées dans la direction des autres diagonales.

Avec un diaphragme croisé (fig. 33), dont l'une des





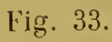


Fig. 33.

branches de la croix est parallèle à l'une des séries de lignes du réseau, l'autre branche à l'autre série, on ne voit pas de losanges, mais bien des rectangles; ainsi l'image d'un objet qui devrait montrer des figures romboïdes montre tout

autre chose, des rectangles. Les lignes de la figure fictive, obtenues ainsi, se coupent à angle droit alors que les lignes réelles se coupent sous un angle de 60°.

5e *expérience.* — La troisième plaque est formée de deux séries de lignes ; les unes tracées sur la lame, les autres sur le couvre-objet. Ces deux séries de traits se coupent à angle droit et donnent l'aspect de la figure 34. L'image dioptrique et les images diffractées montrent la disposition de la

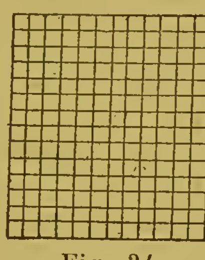


Fig. 34.

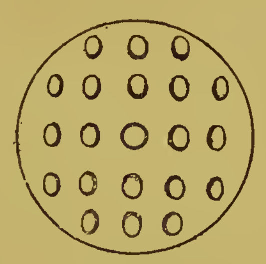


Fig. 34*bis*.

figure 34*bis*. Avec un diaphragme ayant la forme donnée dans la figure 33, placé dans une direction parallèle à l'une des diagonales des carrés, de telle sorte qu'un seul faisceau diffracté pénètre, on aperçoit seulement une seule série de traits, et ces traits n'existent pas dans la figure réelle ; car, comme le montre la comparaison des figures, les lignes fictives se trouvent avoir une direction parallèle à l'autre diagonale des carrés.

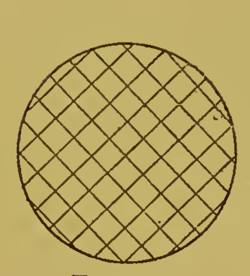


Fig. 35.

Avec un diaphragme croisé, dont les deux branches se placeraient dans la direction des deux diagonales des carrés, on obtiendrait la figure 35.

Conclusions. — Il est temps de tirer quelques conclu-

sions des expériences si décisives que nous venons d'étudier et de résumer les faits acquis.

Les rayons dioptriques centraux sont incapables de donner seuls des images fidèles des petits objets ou des fines structures. Les rayons diffractés sont nécessaires pour produire ces images; celles-ci résultent de la fusion, de la combinaison des rayons centraux avec les rayons diffractés ou images secondaires ; si ceux-là ne sont pas admis dans la formation des images, ces dernières apparaissent sur champ obscur.

Là, seulement, l'on obtiendra une image fidèle de la fine structure de l'objet où l'on sera parvenu à admettre le plus grand nombre de rayons diffractés.

Les images microscopiques d'objets à structure semblables peuvent paraître dissemblables si l'on ne se met pas dans les conditions pour obtenir le plus de rayons diffractés possible; réciproquement, des objets dissemblables pourront donner des images semblables si tous les rayons diffractés n'interviennent pas dans la formation de l'image définitive.

Les petits objets, tels que les cils des infusoires, des flagellés, etc., dont les dimensions ne sont que des fractions de la longueur d'ondulation (valeur moyenne d'une longueur d'onde = 1/2 millième de millimètre) peuvent nous apparaître non dans leurs proportions véritables, mais sous un accroissement de diamètre. On comprendra que la théorie que nous exposons rendra des services dans des questions pareilles à celle de la résolution des diatomées ou dans l'étude de la structure des fibres musculaires; beaucoup de problèmes histologiques seront peut-être résolus, si ceux qui s'occupent de cette science se pénètrent parfaitement de la théorie du savant professeur d'Iéna.

Une distinction doit donc être faite entre l'image produite par des objets d'une certaine étendue dont les dimensions sont des multiples considérables de la longueur d'onde.

S'il s'agit surtout de la considération des contours ou de la structure en gros, l'image est alors formée comme dans le télescope, et elle correspond point par point aux objets; on a alors des phénomènes analogues à ceux de la vision ordinaire. Les rayons dioptriques suffisent à peindre l'image.

Prenons un exemple : si on examine au microscope la plaque quadrillée formée de lignes longuement espacées servant pour compter les globules sanguins, nous aurons une image microscopique du quadrillé dans laquelle les faisceaux diffractés n'interviendront pas; quand il s'agira d'objets un peu plus petits, les rayons de diffraction seront compris facilement dans un petit espace autour du faisceau central; ces faisceaux diffractés sont nombreux; et, dans ce cas, un objectif même d'une ouverture relativement petite donnera encore une image fidèle.

Si l'on a affaire à des objets très petits, les images de diffraction sont plus éloignées et moins nombreuses (dans la 1re expérience, nous avons vu que le nombre des images diffractées est en raison inverse des lignes du réseau); un objectif à grand angle d'ouverture sera alors nécessaire pour recueillir le plus de rayons diffractés possible; d'ailleurs, les expériences qui précèdent prouvent à l'évidence qu'en diminuant l'angle d'ouverture, ce qui revient à empêcher les rayons diffractés d'intervenir dans la formation de l'image, on diminue le pouvoir résolvant.

Prenons maintenant un exemple pratique montrant l'utilité des connaissances qui précèdent.

Si, à l'aide d'un objectif à grand angle d'ouverture (le F, ou mieux le K ou 1/18 de Zeiss), on examine un Pleurosigma angulatum, on voit dans le microscope non muni d'oculaire une image dioptrique centrale et six images diffractées secondaires rangées comme le montre la figure 36.

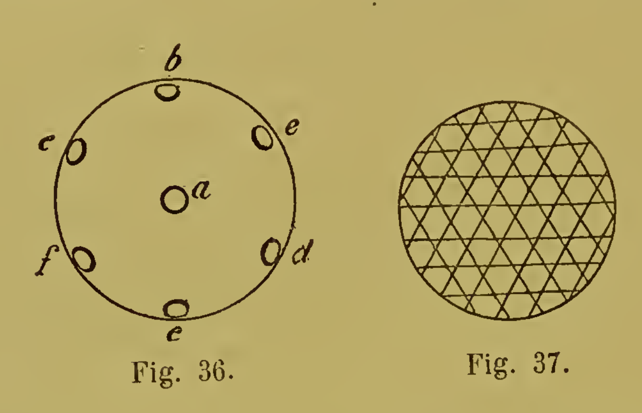


Fig. 36. Fig. 37.

D'après la théorie, ces images doivent correspondre à une structure hexagonale telle que nous allons l'expliquer et telle que le montre la figure 36 ; aux rayons *bae* correspond une série de lignes parallèles coupant *bae* à angle droit (1) ; il en sera ainsi pour *caf* qui correspondent aussi à une série coupant à angle droit *caf;* enfin, une troisième série coupant *gad* correspondant à ces faisceaux et les coupant aussi à angle droit ; on obtiendra ainsi la figure 37. On voit par là que sans examiner certains objets avec le microscope muni de son oculaire, en cherchant seulement la disposition des images secondaires diffractées, il est possible de

(1) On se rappelle que les images secondaires, les spectres, sont perpendiculaires aux lignes du réseau qui lui ont donné naissance (voir fig. 126).

connaître une partie de la structure ; car la figure que nous venons de construire correspond à l'image d'un *Pleurosigma angulatum :* à celle que donne l'observation.

Une grande variété d'apparences fictives peut être obtenue, on le conçoit, en empêchant le passage par le diaphragme des images diffractées.

Deux spectres adjacents *bc* et les rayons centraux donnent des triangles équilatéraux montrant des marques hexagonales. En empêchant *gce* ou *bdf* de passer, nous obtenons des triangles, mais les marques hexagonales sont plus petites.

En admettant les spectres *gc*, *gf* ou *bf*, les hexagones n'apparaissent pas, mais de nouvelles lignes apparaissent se coupant à angle droit ; en variant les combinaisons des spectres, on obtiendra des images différentes qui ne correspondent pas à la structure du *P. angulatum*.

Stephenson rapporte qu'une personne qui n'avait jamais vu une diatomée est parvenue, par des déductions purement mathématiques, à construire le dessin du Pleurosigma angulatum en y indiquant une série de petites marques triangulaires qui se trouvaient entre les hexagones et qui n'avaient jamais été découvertes.

Stephenson ayant examiné de nouveau cette diatomée, en oblitérant le faisceau central et en laissant passer seulement les faisceaux secondaires diffractés, a vu ces marques qui avaient en quelque sorte été prédites par des considérations théoriques.

Nous ferons remarquer en terminant que le test plaque d'Abbe et le microscope sont également appelés à donner une idée exacte de la diffraction et de l'interférence dans les cours généraux de physique. Nous estimons qu'un traité

élémentaire est incomplet s'il ne contient un aperçu rapide de la théorie d'Abbe. Ce sont là des choses qui ne sont pas au delà de ce que peuvent saisir les jeunes gens; de plus, en donnant la théorie du microscope telle qu'on la présente encore actuellement, on enseigne des choses incomplètes et fausses.

CONCLUSIONS PRATIQUES A TIRER DES THÉORIES QUI PRÉCÈDENT.

1° Quand il s'agit de fines structures, il est absolument indispensable d'employer des objectifs à grandes ouvertures. Mais pour des éléments qui sont des multiples considérables de la longueur de l'onde lumineuse, on employera des objectifs à faible ou à modérée ouverture.

2° Les recherches microscopiques n'ont pas toujours pour but de résoudre les éléments infiniment petits qui constituent un objet; le plus souvent, même en histologie, la grosse structure est considérée seule, sans que l'on se préoccupe des minimes parties; il est évident qu'il est inutile, dans ces circonstances, d'employer de grandes ouvertures. — Il est inutile, également, de faire usage d'objectifs à grande ouverture, à grossissement faible. Si de minimes détails sont représentés alors par l'objectif, à l'œil, par défaut d'un angle visuel suffisant, ils ne seraient pas visibles. On peut donc conclure de là que les objectifs à grande ouverture doivent être à haute amplification. En d'autres termes, les grandes ouvertures correspondent à des longueurs focales faibles; les basses et modérées ouvertures à de grandes longueurs focales. (L'amplification est la raison inverse des longueurs focales : page 20.)

3° On se gardera bien d'acheter des objectifs à immersion de faible longueur focale, telle que $\frac{1}{50}$ de pouce. — De tels *objectifs*, à cause de la difficulté d'exécution, ont rarement une ouverture numérique supérieure à 1.00 ; la limite de résolution est épuisée bien avant le grossissement. Un tel objectif ne donnera rien de plus qu'un autre fournissant 1000 à 1200 diamètres, mais d'une ouverture plus grande.

4° Quand on aura à examiner des objets dont on ne veut pas connaître la fine structure, il est toujours utile de voir, en même temps, plusieurs plans de la préparation; il faut alors employer des ouvertures modérées d'objectifs jouissant d'une certaine pénétration; il en est ainsi dans bon nombre de travaux histologiques.

Les hautes amplifications et, par conséquent, les grandes ouvertures, ne correspondent pas à des objectifs pénétrants; de telles ouvertures ne sont employées que pour l'examen d'objets tout à fait plats; et si on étudie un objet d'une certaine épaisseur, c'est au moyen de sections optiques successives que l'on se fera une idée de la préparation, et cela, en étudiant les différents plans de l'objet. Le microscope devient alors un véritable microtome optique.

Certaines préparations, examinées avec des objectifs à grande ouverture, paraissent quelquefois comme dans un brouillard; on a dit pour cela que ces objectifs manquent de définition. C'est le cas pour des préparations épaisses; un objectif à grand angle ne manque pas de définition; c'est ordinairement le contraire qui a lieu si les corrections sont bien exécutées.

Dans ces derniers temps, surtout en Angleterre, on s'est

laissé aller jusqu'à demander, pour des objectifs à grandes distances focales, telles que 1 pouce et 1/4 de pouce, des angles de 45° à 100° et même de 60° à 140°; de tels objectifs, avec 15° à 60°, étaient considérés comme des appareils surannés. Des idées semblables, dit Abbe (1), sont de fatales méprises, qui peuvent avoir des effets pratiques amenant une rétrogradation de l'optique microscopique.

Le travail scientifique avec le microscope peut toujours demander, non seulement une forte amplification, en même temps que la plus grande ouverture possible, mais aussi de bons objectifs faibles ou modérés, avec des ouvertures faibles ou modérées, donneront également de bons résultats.

5° Par le nombre et la disposition des faisceaux de diffraction admis en examinant un *test* connu, on appréciera la valeur d'un objectif sous le rapport de la *résolution*. Ainsi un objectif capable de résoudre le *Pl. angulatum* devra montrer six spectres diffractés occupant les sommets de l'hexagone inscrit comme le montre la figure 36. Pour procéder à cet essai, on met le *test* choisi au point comme à l'ordinaire; puis on examine en ayant soin d'enlever l'oculaire.

OBJECTIFS A CORRECTION (fig. 38).

Les objets qui sont examinés au microscope sont le plus souvent recouverts d'une lamelle de verre mince appelée couvre-objet, cover, deck-glass. Il conviendrait pour la facilité des descriptions, comme M. Errera l'a proposé, d'ap-

(1) Journal R. M. S — The Relation of Aperture and Power in the Microscope; — june 1882.

peler ce verre protecteur tout simplement *lamelle;* on réser-

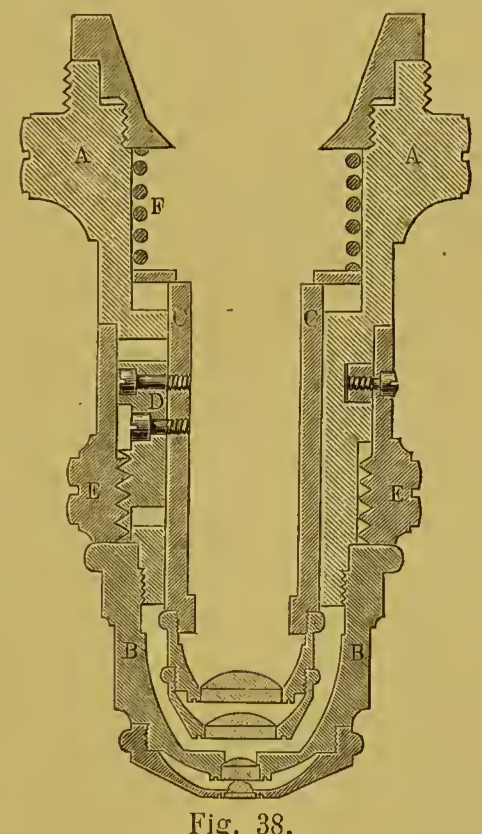


Fig. 38.

verait le nom de *lame* à ce qui porte actuellement le nom de porte-objet.

Pour les préparations définitives, la lamelle protège l'objet de la poussière; on ne conserverait aucune préparation sans ce verre; les chocs, le frottement auraient bientôt tout enlevé. Quand il s'agit de préparations temporaires, la lamelle empêche l'évaporation trop rapide des réactifs. Dans tous les cas, le rôle principal des lamelles est de rendre parallèles les surfaces d'entrée et de sortie des rayons de la lumière transmise.

Les objectifs à sec (à air) ou à immersion à eau sont affectés dans leurs effets par la lamelle, si celle-ci n'est pas convenablement choisie; en effet, les indices de réfraction des milieux employés (air et eau) étant moins élevés que celui de la lamelle, les rayons en traversant la mince couche de verre sont déviés plus ou moins suivant l'épaisseur. Il en résulte qu'il faut tenir compte de ce phénomène dans la correction des lentilles lors de leur construction.

Les objectifs à monture fixe sont corrigés pour une épaisseur de verre déterminée; disons aussi qu'ils le sont encore pour une certaine longueur de tube. Pour les objectifs forts, quand on voudra en tirer tout le parti possible, il est nécessaire de tenir compte de ces deux conditions. Si l'on désire appliquer des longueurs de tube variées et des lamelles de diverses épaisseurs, il faut que l'objectif soit *à correction variable*. La correction s'obtenant non seulement par des combinaisons de flint et de crown, mais encore par la distance entre les verres qui constituent l'objectif, il est évident qu'on obtiendra des résultats convenables en faisant varier cette distance; — c'est ce que l'on réalise dans la pratique.

Le meilleur système de correction est celui dans lequel la lentille frontale est fixe dans la monture; les autres verres changent de position suivant la verticale; ils remontent ou redescendent d'une certaine longueur par le mouvement d'un anneau.

La figure 38 représente en coupe un objectif à correction (et à immersion). CC est l'armature interne mobile sur laquelle sont montés deux systèmes de verres convergents; cette partie est mise en mouvement par l'anneau EE portant un pas de vis; un ressort à boudin F oblige

la pièce que nous venons de décrire à suivre tous les mouvements imprimés par l'anneau correcteur EE. Le cône BB qui porte la frontale est immobile; il en est de même de la partie supérieure AA.

Pour corriger un objectif, on avance l'anneau correcteur jusqu'à ce que l'image de l'objet examiné paraisse exempte des aberrations chromatique et sphérique.

Les objectifs à correction de Zeiss portent 12 divisions qui correspondent à l'épaisseur du verre depuis 10 jusque 22μ. Pour une longueur de tube de 1,55, il suffit de faire correspondre la division marquant l'épaisseur du verre à l'index de l'objectif.

Les liquides des objectifs à immersion homogène possédant un indice de réfraction égale à celui de la lamelle, il est évident, d'après la théorie que nous avons exposée antérieurement, que la réfraction produite par la lamelle est complètement neutralisée; l'épaisseur des couvre-objet n'a là aucune influence. La correction, pour de tels objectifs, ne rendra de services que pour autant que l'on veuille faire usage de longueurs de tube variables.

Mais il est préférable de ne pas appliquer la correction aux objectifs homogènes; les erreurs de correction sont plus grandes que celles causées par de petites différences de longueur de tube; et quand le microscope est à tirage, il suffit de ramener le tube à la longueur pour laquelle l'objectif a été construit. Quand on voudra une amplification considérable, on n'employera pas de longs tubes, mais de forts oculaires; les *homogènes*, en effet, donnent ainsi de bonnes images.

La correction a le grave inconvénient de produire le décentrage des lentilles par le mouvement répété de l'anneau; or, le

moindre défaut dans le centrage est fatal aux objectifs à l'huile.

La correction sera utile aux objectifs à sec et à immersion à eau, là où l'influence de la réfraction dans la lamelle se fait sentir par les différences des indices.

Pour les objectifs à monture fixe, on se rappellera que pour en tirer tout ce qu'ils peuvent donner, ils sont construits pour une longueur de tube et pour une épaisseur de couvre-objet. Ceci n'a, cependant, rien d'absolu; car il y a toujours une certaine tolérance dans l'emploi des deux facteurs — épaisseur de verre et longueur de tube — avec laquelle on obtient encore de bons résultats. Cependant, si l'on se trouve obligé d'augmenter la longueur de tube au delà de ce qui est indiqué, on parviendrait à corriger convenablement en employant des lamelles très minces.

Rappelons à ce sujet qu'il est indispensable quand on veut essayer des objectifs de tenir compte de ce qui précède; on pourrait sans cela rejeter comme mauvais des objectifs très bons en les examinant dans de mauvaises conditions.

Les objectifs de Zeiss à monture fixe portent l'indication de l'épaisseur des lamelles pour laquelle ils sont corrigés. C'est là un exemple qui devrait être suivi par tous les constructeurs.

SOINS A DONNER AUX OBJECTIFS.

1° Il est préférable de renfermer les objectifs dans des boîtes cylindriques en laiton; — dans des écrins, la poussière pénètre trop facilement.

2° On ne dévissera jamais les lentilles qui forment les doublets des objectifs; une telle manœuvre finit par produire le décentrage.

3° Quand, par une raison quelconque, il faudra nettoyer les lentilles — la frontale ou l'émergente — on le fera avec du linge fin et vieux et surtout bien propre, afin de ne pas rayer le verre. La moelle de sureau fraîchement coupé a été également recommandée.

4° En subissant des chocs par la chute ou tout autrement, les lentilles se décentrent : les objectifs peuvent être ainsi gravement endommagés; le moindre décentrage pour les systèmes forts et surtout les homogènes leur fait perdre toutes leurs qualités.

5° Les objectifs seront conservés dans des endroits où la température ne soit ni trop élevée, ni trop basse : le baume qui unit les lentilles pourrait se vitrifier; c'est ce qui fait que certains objectifs deviennent troubles.

6° Le liquide d'immersion des objectifs homogènes est fourni par le constructeur; on en fera usage à l'exclusion de tout autre.

Il pourrait arriver qu'avec des huiles éthérées (anis, fenouil, etc.), le liquide pénètre dans la monture; ces liquides seront employés avec prudence et enlevés avec le plus grand soin après usage.

Pour enlever les liquides d'immersion, on emploie du papier buvard d'abord, puis du linge fin et mou, que l'on humecte de benzine quand on se sert des huiles.

7° Dans le travail courant, on placera les objectifs sous une petite cloche déposée sur une plaque de verre.

*

OCULAIRES.

Les oculaires ordinaires sont formés de deux verres con-

vergents plano-convexes, placés à une certaine distance et montés aux deux extrémités d'un tube variant de longueur; ce dernier glisse à frottement doux dans la partie supérieure du tube du microscope.

Les courbures des lentilles sont tournées inférieurement vers l'objectif. Un diaphragme est disposé à peu près au milieu du tube.

La lentille inférieure est appelée *verre de champ* ou *verre collecteur;* l'autre lentille prend le nom *de verre de l'œil* ou *verre oculaire.*

Que l'on supprime le verre de champ, l'on ne verra plus de l'objet examiné qu'une très petite partie; à chaque déplacement de l'œil, une fraction différente de la préparation se montrera.

L'oculaire que nous venons de décrire est ordinairement appelé oculaire d'Huygens.

Les constructeurs donnent à leurs oculaires des pouvoirs amplifiants très divers. Zeiss possède cinq numéros qui, avec une longueur de tube de 155 millimètres, donnent respectivement des grossissements de 3, 4, 5 1/2, 7 1/2 et 10.

On se sert ordinairement d'oculaires de moyenne amplification; tels sont le 2 et le 4 de Zeiss.

Il faut adopter comme règle de ne rechercher les forts grossissements qu'à l'aide de forts objectifs.

Pour fixer les idées, prenons un exemple : l'objectif B de Zeiss avec l'oculaire 5 donne un grossissement de 225 diamètres (longueur de tube : 155 millimètres). Le D donne, avec l'oculaire 2, un pouvoir de 230 diamètres; c'est cette dernière combinaison qui sera préférable. Nous avons dit, antérieurement, en effet, que les oculaires puissants exagéraient

les restes des aberrations des objectifs, en raison de leur pouvoir amplifiant.

Ordinairement, on fait l'acquisition de deux ou plusieurs oculaires. En adoptant pour base les instruments de Zeiss, on choisira, en en prenant deux, les n°s 2 et 4; si l'on en prend trois, les n°s 2, 4 et 5 conviendront alors le mieux. Pour les autres constructeurs, on fixera son choix d'une façon analogue.

Kelner de Wetzlar a rendu achromatiques ses oculaires; on les a appelés, pour cette raison, *orthoscopiques*. Pour les usages ordinaires, ils sont inutiles; mais pour la photomicrographie, ils sont nécessaires.

Tolles, de Boston, et Hartnack ont confectionné des oculaires en taillant sur un cylindre de crown-glass deux surfaces courbes inégales; ils ont rodé circulairement une rainure à une certaine hauteur, là où devait se trouver le diaphragme.

OCULAIRE MICROMÈTRE.

Pour les mensurations, on a imaginé un oculaire disposé



Fig. 39.

de façon à permettre l'introduction d'un micromètre (fig. 39) au-dessus du diaphragme. Le tube qui forme ces oculaires (fig. 40) se sépare en deux moitiés, suivant la direction du diaphragme; il suffit pour cela de dévisser en B les deux pièces qui composent le tube; on peut ainsi introduire le micromètre

oculaire. Le verre de l'œil n'est pas fixe à l'extrémité du tube, mais il est adapté à un deuxième cylindre A, qui glisse dans le tube principal de l'oculaire. On mettra ainsi facilement le micro-oculaire au foyer du verre de l'œil, pour mieux voir les divisions. Dans l'oculaire qui vient d'être décrit, on disposera également des lames quadrillées en réseau, soit pour la numération des fins objets, tels que corpuscules sanguins, bactéries ou même pour rendre le dessin plus facile.

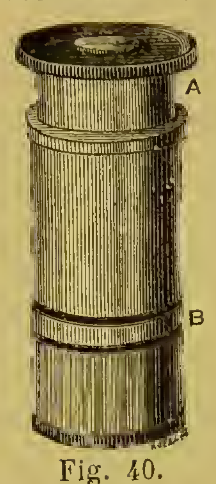


Fig. 40.

Zeiss fournit des micro-oculaires qui se mettent dans ses oculaires ordinaires n° 3, sans qu'il y ait besoin de la disposition qui précède. L'image des divisions du micro-oculaire est projetée sur le champ du microscope.

Quant au *micro-oculaire* (fig. 39), c'est un disque circulaire de verre, au milieu duquel on a divisé la longueur d'un 1/2 centimètre en 50 parties égales. Les 50 divisions se trouvent projetées sur le champ du microscope.

CHAMBRES CLAIRES *(Camera lucida).*

Un nombre considérable de chambres claires ont été imaginées ou décrites ; on est loin d'être d'accord sur la valeur de chacune d'elles ; à la longue, on s'habitue à l'instrument que l'on a adopté ; il s'ensuit que l'outil qui nous est familier est pour nous le meilleur ; c'est aussi celui que l'on recommande aveuglément ; ce parti pris est surtout vrai pour l'appareil qui nous occupe. Quelque perfectionnée qu'elle soit, une *camera* nécessite un apprentissage assez long pour en tirer tout le parti désirable ; c'est ce qui fait que l'on regarde à tort,

comme défectueuses, certaines formes d'instruments qui donneraient également de bons résultats si on apprenait à les manier. Cependant, il faut rejeter toute chambre claire donnant des images altérées, phénomène que l'on a appelé *distorsion;* il en sera de même quand on sera obligé de dessiner sur un plan incliné pour obtenir une image exacte.

Nous décrirons les modèles de chambres claires les plus usitées.

La chambre d'Oberhauser (fig. 41) est formée essentiellement de deux prismes triangulaires A et B, entre lesquels

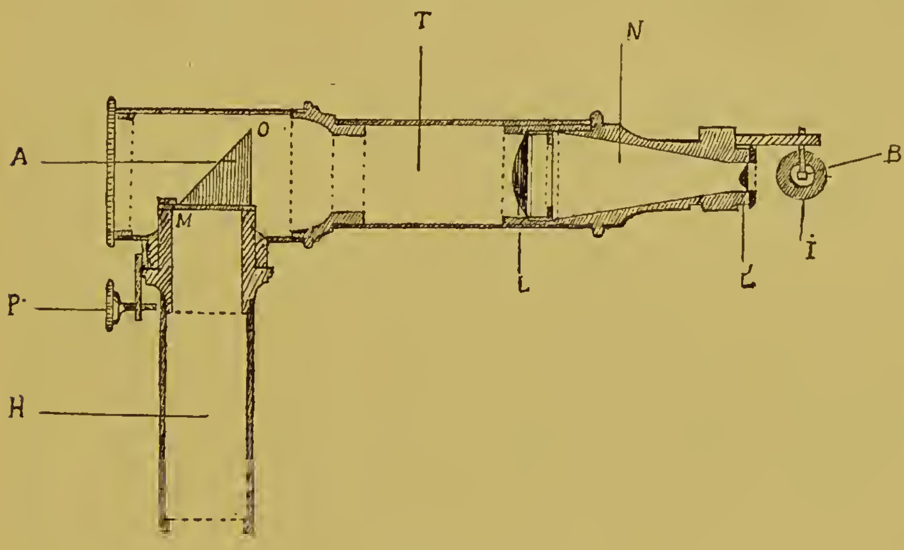


Fig. 41.

ment de deux prismes triangulaires A et B, entre lesquels est fixé un oculaire. Le premier A, le plus grand, est placé au-dessus du tube du microscope. L'image subit la réflexion totale à la surface de OM; l'oculaire N, formé des lentilles L et L', projette l'image sur le petit prisme B à l'extrémité du tube. Un disque I perforé, appliqué au tube T par une bague mobile, permet d'examiner l'image qui paraît projetée sur le papier placé au pied du microscope.

Cette *camera* s'adapte au microscope à la place de l'oculaire par l'intermédiaire du tube H. Une vis de pression P assure la stabilité de l'appareil.

Pour se servir de cet instrument, on met au point une préparation comme à l'ordinaire; on enlève l'oculaire que l'on remplace par la chambre claire; on descend doucement le tube par la vis micrométrique jusqu'à ce qu'on aperçoive à travers l'ouverture I l'image de la préparation.

L'image est plus grande que celle obtenue avec l'oculaire correspondant à celui que la chambre porte. Le champ a un diamètre moindre. Ce sont là, sans doute, des inconvénients; mais les images sont exemptes de distorsion et elles sont projetées loin du pied du microscope; ce qui permet de dessiner aisément.

En modérant l'arrivée de la lumière, afin que les rayons réfléchis sur le papier soient également intenses, qu'ils proviennent de la camera ou de l'extérieur, on verra convenablement la pointe du crayon. On parvient à ce but en plaçant devant le papier sur lequel on dessine un écran en carton. On peut aussi faire usage d'un châssis en carton dans lequel on fixe, comme une vitre, une feuille de papier à calquer translucide.

Une bonne camera d'Oberhaüser permet de dessiner facilement avec les plus forts grossissements.

Fig. 42.

CHAMBRE CLAIRE DE NACHET (fig. 42). — Nachet construit une chambre claire qui donne d'excellents résultats et que nous recommandons particulièrement. Elle est formée de deux prismes; l'un est placé

au-dessus de l'oculaire; l'autre, fixé à une certaine distance, permet de suivre le crayon sur le papier. Pour régler l'intensité de la lumière, on y a adapté un verre coloré, enchâssé dans un anneau que l'on dispose comme l'indique la figure 42.

La chambre claire de *Milne Edward et Doyère* est aussi formée de deux prismes; elle est également recommandable.

Ces deux formes de chambres claires sont employées avec un oculaire ordinaire; on les écarte facilement en les retirant sur le côté; ainsi on passe facilement à l'examen direct de la préparation sans enlever l'appareil du microscope. Cette disposition n'est pas possible avec la camera d'Oberhaüser.

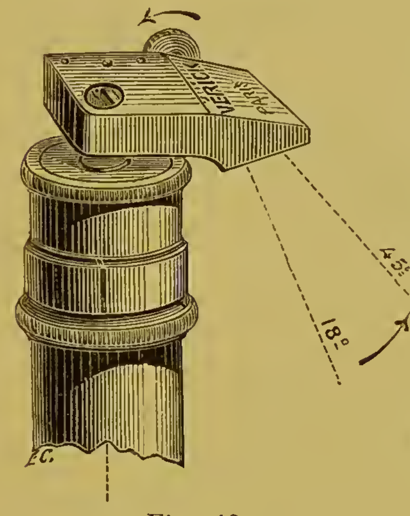


Fig. 43.

Le Dr Malassez a décrit (*Société biologique,* mai 1885) une chambre claire (fig. 43), dans laquelle on règle à volonté l'inclinaison du prisme externe. Pour arriver à ce but, il suffit de faire mouvoir la virole dans le sens de la flèche comme l'indique la figure 43.

Avec une inclinaison à 18 degrés, on a la chambre claire ordinaire. Elle présente alors l'inconvénient d'obliger le dessinateur à placer le papier sur un plan incliné. En prenant l'inclinaison de 45 degrés et en inclinant le microscope de façon à dessiner en arrière du pied de l'instrument, on obtient des images sans distorsion et parfaitement exactes. Cette chambre claire est construite par Verick.

Chambre claire d'Abbe (fig. 44). Elle est formée : 1° d'un

petit cube de verre W qui résulte de la combinaison de deux petits prismes triangulaires appliqués par leur face hypothénuse; celle-ci est argentée; une petite ouverture est pratiquée dans une mince couche métallique.

2° D'un miroir S*p* mobile et porté par une tige métallique, comme le montre la figure 44.

Les rayons du papier et du crayon suivent la direction S_2

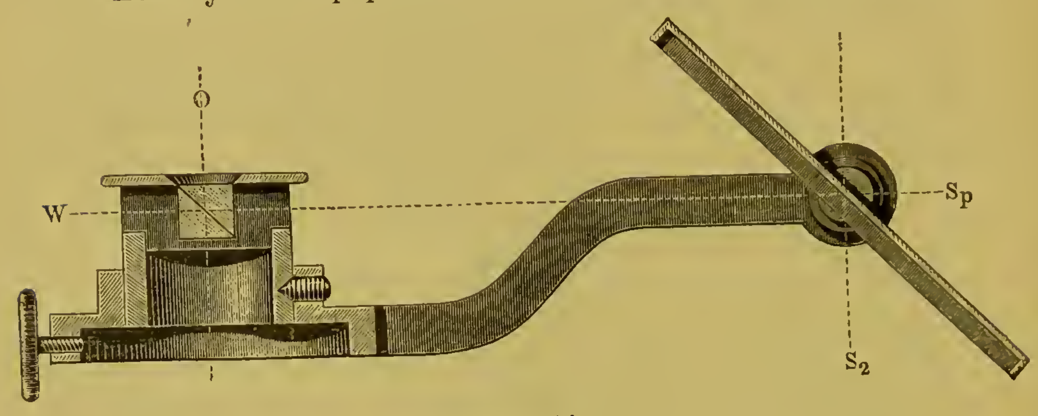


Fig. 44.

et sont réfléchis sur le miroir; en même temps, les rayons venant de l'image formée dans le microscope se réfléchissent également suivant WS*p*. On peut ainsi tenir en coïncidence l'image et le crayon.

L'intensité de la lumière se règle par deux plaques de verre enfumé, adaptées à la monture du prisme; elles ne sont pas indiquées dans la figure. La chambre claire d'Abbe s'applique sur l'oculaire n° 3 de Zeiss. Le miroir étant mobile autour de l'axe, pour dessiner on l'amène dans une position convenable. Après un apprentissage assez long, cet appareil donne d'excellents résultats; il peut être employé pour dessiner avec une loupe quand on ne veut que de faibles amplifications.

On emploie beaucoup en Angleterre une chambre claire très simple, due à Beale. Cet instrument, qui exige l'inclinaison du microscope, est formé d'un tube s'appliquant sur l'oculaire et portant à son extrémité une lame de verre légèrement teinté de bleu; cette dernière est inclinée suivant un angle de 45° par rapport à la première lentille de l'oculaire.

L'image de l'objet à dessiner vient se réfléchir sur la face supérieure de la lame de verre; par une illusion d'optique, facile à expliquer, l'œil peut suivre le crayon traçant tous les détails de l'image paraissant projetée au pied du microscope où l'on place une feuille de papier blanc.

Cette chambre claire s'improviserait sans difficulté; à l'extrémité d'un oculaire, il n'y aurait qu'à maintenir, à l'aide d'un fil de fer et inclinée à 45° par rapport à la dernière lentille, une lame de verre mince, un couvre-objet, par exemple. En inclinant le microscope, l'image se réfléchira sur la face de la lamelle et l'objet sera convenablement projeté, de façon à ce qu'on puisse en prendre les contours.

La chambre claire de Beale présente un défaut capital : l'image vient se former sur la lamelle réfléchissante trop près de l'oculaire. Il en résulte que tout le champ du microscope n'est pas complètement perçu par l'œil; tandis que, par exemple, le centre est visible, la phériphérie reste obscure, et pour voir successivement tous les détails du champ, il est nécessaire de déplacer l'œil. De plus, le court espace laissé libre entre l'oculaire et la lame gêne beaucoup le travail.

Pour obvier à ces inconvénients, nous avons remplacé l'oculaire par une seule lentille qui donne une image venant se réfléchir sur une simple lame de verre inclinée. Au lieu de la lame de verre, nous employons encore un miroir; dans

ce dernier cas, l'image est obtenue par la double vue. L'inclinaison de la surface réfléchissante peut varier entre 40 à 50°, suivant la place de la table où l'on voudra projeter l'image. Celle-ci est d'ailleurs redressée.

La chambre claire ainsi construite s'applique sur le microscope incliné; les images sont parfaites; elles comprennent tout le champ du microscope. Les contours peuvent être suivis très facilement en même temps que l'on perçoit la pointe du crayon.

On peut aisément construire soi-même cet appareil. Comme oculaire, on emploie une lentille d'une loupe ordinaire grossissant de 3 à 6 fois; on la place dans un tube en carton. Ce dernier est coupé obliquement, de façon que sur la section elliptique on puisse appliquer une lame réfléchissante mince ou un miroir. A la partie supérieure, on ménage une ouverture exactement au-dessus de la place où l'image vient se réfléchir.

En adoptant le même principe et en remplaçant dans la chambre claire d'Oberhaüser le grand prisme par un miroir et l'oculaire à deux lentilles *par une seule lentille,* le petit prisme par une lame réfléchissante ou un miroir, on a également un instrument convenable qui ne nécessitera pas l'inclinaison du microscope.

Pour arriver à ce résultat, dans l'angle droit d'un tube coudé, on place un miroir incliné de 45° sur l'horizontale, de façon que ce dernier soit exactement au-dessus de l'objectif. Dans l'autre partie du tube, nous disposons la chambre claire, telle que nous l'avons décrite plus haut, et qui est composée d'une lentille et d'une lame de verre s'inclinant à volonté, suivant un angle de 40 à 50°.

Ainsi construits, ces instruments coûteront beaucoup moins que ceux que l'on emploie généralement. Ils seront utiles surtout aux débutants qui ne sont pas toujours disposés à faire l'achat d'appareils coûteux. Ils pourront ainsi, avec un peu d'adresse et un peu de patience, se construire un accessoire de la plus haute utilité qui leur rendra d'ailleurs tous les services d'un instrument plus coûteux. — Plus tard, ils feront l'acquisition de l'une des chambres claires qui ont été décrites.

QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR L'EMPLOI DE LA CHAMBRE CLAIRE.

En se servant de n'importe quelle chambre claire, on a surtout pour but de prendre en gros les contours des objets à étudier ou bien encore de fixer la place relative des différentes parties d'un tout. L'ébauche du dessin étant ainsi préparée, on ajoute les menus détails sans la *camera*. C'est du moins ce qui se fait ordinairement. Toutefois, avec de la patience et de l'application, on arrive à dessiner les choses les plus délicates avec la chambre claire.

La chambre claire sert aussi à fixer les dimensions des objets que l'on étudie; c'est l'un des *procédés de mensuration* le plus sûr. Il faut se servir en même temps d'un *micromètre-objectif*. On appelle ainsi une lame de verre sur laquelle on a divisé vers le milieu la longueur d'un millimètre en 100 parties égales. L'espace divisé étant placé sous l'objectif, on met au point; on applique la chambre claire comme à l'ordinaire. On dessine les traits du *micro-objectif* qui sont projetés sur le papier; on obtient une échelle nouvelle dont les divisions représentent des $\frac{1}{100}$ de millimètre amplifiés.

Après avoir tracé les contours d'une cellule à la chambre claire, il suffira d'en mesurer le diamètre sur le dessin à l'aide d'un compas et de rapporter cette mesure à l'échelle obtenue en dessinant les divisions projetées du *micro-objectif*. Si le diamètre de l'image de la cellule a la longueur de deux divisions, c'est que cette cellule a un diamètre réel de deux centièmes de millimètre.

MENSURATION PAR LE MICRO-OCULAIRE ET LE MICRO-OBJECTIF.

Le micro-oculaire étant appliqué au tube, le micro-objectif mis au point sous le microscope, on fait coïncider un certain nombre de divisions du premier avec un certain nombre du second; on sait ainsi quelle est la valeur d'une division du micro-oculaire; un simple calcul peut l'établir.

Pour fixer les idées, supposons que 7 divisions du micro-oculaire correspondent exactement à 3 du micro-objectif; on saura ainsi que 7 divisions du micro-oculaire répondent à $\frac{3}{100}$ de millimètre et une division vaudra $\frac{3}{100 \times 7}$.

Si 10 divisions du micro-oculaire sont projetées sur la largeur d'un objet quelconque, d'un *Pleurosigma angulatum*, par exemple, c'est que cette diatomée aura une largeur de $\frac{10 \times 3}{7 \times 100} = 0,0402$ mm. (L'opération qui précède est faite pour une longueur de tube déterminée.) Les micrographes ont adopté comme unité de longueur le millième de millimètre (0,001mm.). Cette unité est appelée micro-millimètre ou micron par les auteurs; on la désigne par la lettre grecque μ (1).

(1) Deux questions de terminologie par M. Leo Errera. *(Bulletin de la Société belge de Microscopie.* Octobre 1884.)

Zeiss a construit une table donnant la valeur d'une division du micro-oculaire pour chaque objectif avec les oculaires 2 et 3, pour une longueur de tube de 155 mm. Les valeurs indiquées sont des moyennes suffisamment exactes pour le travail courant; quand on voudra une mesure absolument précise, on emploiera la chambre claire et le micro-objectif comme il a été indiqué plus haut; c'est la méthode la plus exacte; la combinaison du micro-oculaire et du micro-objectif donne aussi de bons résultats.

Nous donnons ci-dessous le tableau de Zeiss. — Si on possédait des objectifs et oculaires d'autres constructeurs, on dresserait facilement ce tableau soi-même. Il serait pourtant à désirer que chaque constructeur dressât lui-même cette table.

LONGUEUR DE TUBE 155 MM.

OBJECTIF	OCULAIRE 2 (Micro-millimètre)	OCULAIRE 3 (Micro-millimètre)
a^1	83	75
a^2	46	42
a^3	33	30
aa	32	29
A. AA	16	14
B. BB	10	9
C. CC	6.7	6
D. DD	4	3.6
E	2.7	2.4
F	1.8	1.6
G	2.9	2.6
H	2.3	2.1
J	1.65	1.50
K	1.30	1.16
L	1.05	10.95
1/12	1.82	1.67
1/18	1.20	1.08

ÉCLAIRAGE.

Autant que possible, les observations microscopiques se feront pendant le jour; la lumière naturelle est celle qui convient le mieux, surtout s'il s'agit du travail général.

Quand on le pourra, on se servira de la lumière réfléchie par un mur blanc ou par les nuages. On recommande, lorsqu'on a le choix de la situation, de prendre le jour de la salle de travail vers l'est ou le nord. — On n'emploiera jamais les rayons venant directement du soleil.

Pour le travail du soir, on se servira de la lumière blanche produite par une lampe à pétrole. Il existe des lampes spéciales, entre autres la lampe de Collins, qui sont particulièrement adaptées aux observations microscopiques; elles sont ordinairement supportées par une tige métallique solidement fixée à un pied très lourd. On peut élever et abaisser la lampe pour lui faire occuper une hauteur convenable; un abat-jour cylindrique en opale et percé d'une fente recouvre la cheminée.

Cet appareil peut être construit par n'importe quel lampiste un peu adroit et à un prix bien inférieur à celui qu'exigent les constructeurs de microscopes.

Les lampes pour micrographes sont ordinairement à mèche plate, afin d'avoir un pinceau de lumière étroit, et ne donnant pas une image développée de la flamme; ceci n'est nécessaire que dans certains cas. Mais les flammes provenant d'une telle mèche ne sont jamais bien éclairantes, tandis qu'on peut, en introduisant dans la flamme un cylindre de toile métallique fermé complètement à la partie supérieure,

obtenir une lumière d'une extrême blancheur; c'est ce système de lampe que nous recommandons. Quand on voudra un étroit faisceau de rayons lumineux, on adaptera sur le verre de la lampe une cheminée en laiton noirci, percée d'une fenêtre se fermant par deux petits volets glissant de façon à n'ouvrir aux rayons lumineux qu'une petite fente à bords parallèles.

Aux lampes spéciales, une loupe condensatrice portée par un bras articulé est souvent fixée. On remplacera cette disposition coûteuse par un ballon de 1/2 à 1 litre de capacité; on le remplira d'eau limpide; on aura ainsi un excellent condenseur. Veut-on maintenant avoir de la lumière bleue pour l'*éclairage monochromatique?* On remplacera l'eau dans le ballon par une dissolution plus ou moins concentrée de sulfate de cuivre à laquelle on ajoutera quelques gouttes d'ammoniaque pour faire virer au bleu foncé. Quand on désirera d'autres couleurs, jaune, rouge, etc., on fera usage de bichromate potassique, ou de carmin ammoniacal, etc.

L'ÉCLAIRAGE MONOCHROMATIQUE dont nous venons de parler est obtenu par l'emploi de rayons d'une seule couleur du spectre; il peut rendre de grands services dans la résolution de fines structures (voir page 112).

Un appareil imaginé par Hartnack, et produisant la lumière monochromatique, se trouve dans le commerce; on ne l'applique ordinairement qu'aux grands statifs. Avec un fort éclairage, des verres de diverses couleurs produisent aussi de bons résultats. Les objets opaques sont examinés par la lumière directe projetée, le plus souvent, par une loupe d'éclairage. Ce moyen est rarement nécessaire en histologie ou en anatomie comparée.

C'est par la lumière transmise, réfléchie par le miroir du microscope, qu'on éclaire les objets transparents.

Un miroir plan et un miroir concave sont presque toujours adaptés au microscope.

Le premier est employé seulement avec de faibles grossissements. On fait des observations à la LUMIÈRE CENTRALE *quand on se sert des rayons réfléchis par le miroir suivant l'axe de l'appareil, et tombant perpendiculairement sur l'objet étudié; tandis qu'avec la* LUMIÈRE OBLIQUE, *les rayons tombent sur la préparation en faisant avec l'axe optique un angle plus ou moins grand.* En écartant le miroir, on obtient cet effet de lumière si utile dans les fines résolutions. C'est pour donner les effets de l'obliquité des rayons que les miroirs des microscopes sont portés par des bras articulés de diverses façons; chaque constructeur adopte une articulation plus ou moins compliquée.

Le mode de suspension le plus simple et le plus pratique, permettant de faire occuper toutes les positions du miroir sous la table, a été atteint par Zeiss; aucun constructeur ne devrait adapter le miroir autrement sous la platine.

Des diaphragmes sont disposés sous la table du microscope; quelquefois, dans les petits modèles, une plaque circulaire tournante, percée de trous de différents diamètres, en tient lieu; cette dernière disposition n'est pas recommandable, parce que le disque est bientôt décentré, et parce qu'il n'est pas possible de faire varier la distance de l'ouverture à la préparation. On préfère les diaphragmes à cylindre que l'on place dans une pièce glissant à tiroir sous la platine.

Les diaphragmes sont très utiles pour modérer l'arrivée

des rayons lumineux, pour accuser d'une façon nette et précise les fines structures.

Dans la pièce où l'on introduit les diaphragmes, on place également des verres colorés (lumière monochromatique) et même des lentilles condensatrices.

Pour employer l'immersion à la recherche des bactéries

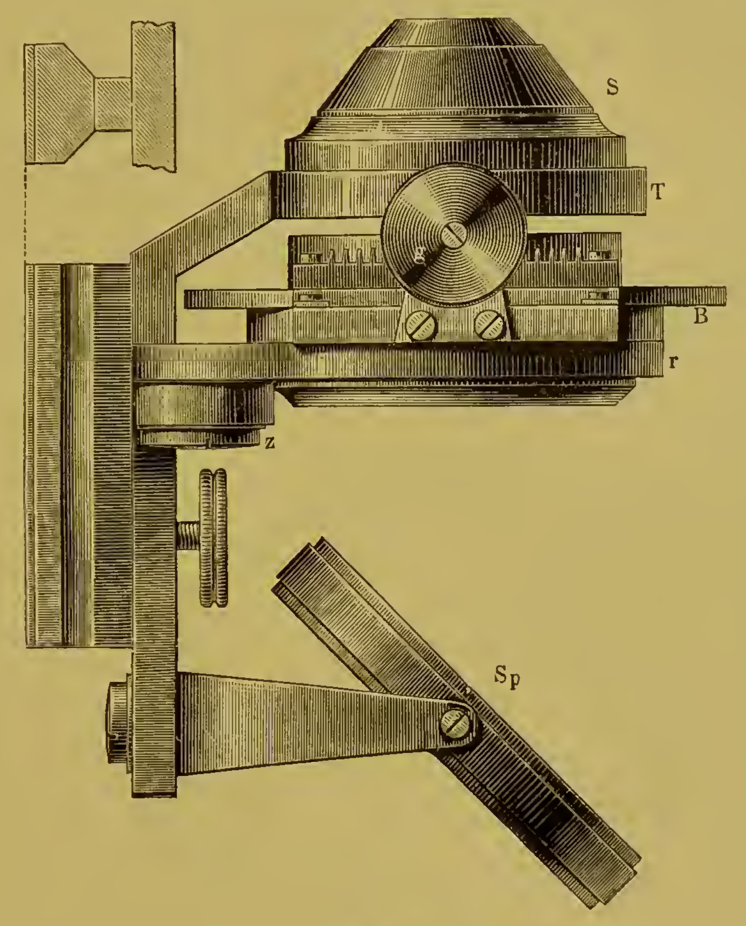


Fig. 45.

par la lumière centrale *(méthode de Koch)*, Zeiss et Reichert fournissent un condenseur spécial formé d'une lentille hémisphérique à grande ouverture. On fixe cet appareil dans la

pièce porte-diaphragme au lieu et place des diaphragmes. On peut l'élever et le redescendre pour obtenir des cônes lumineux plus ou moins intenses et différents effets de la lumière centrale.

Éclairage par les condensateurs. — Depuis l'emploi des objectifs à grandes ouvertures, on a fait usage de divers condensateurs. L'appareil de ce genre le plus simple et

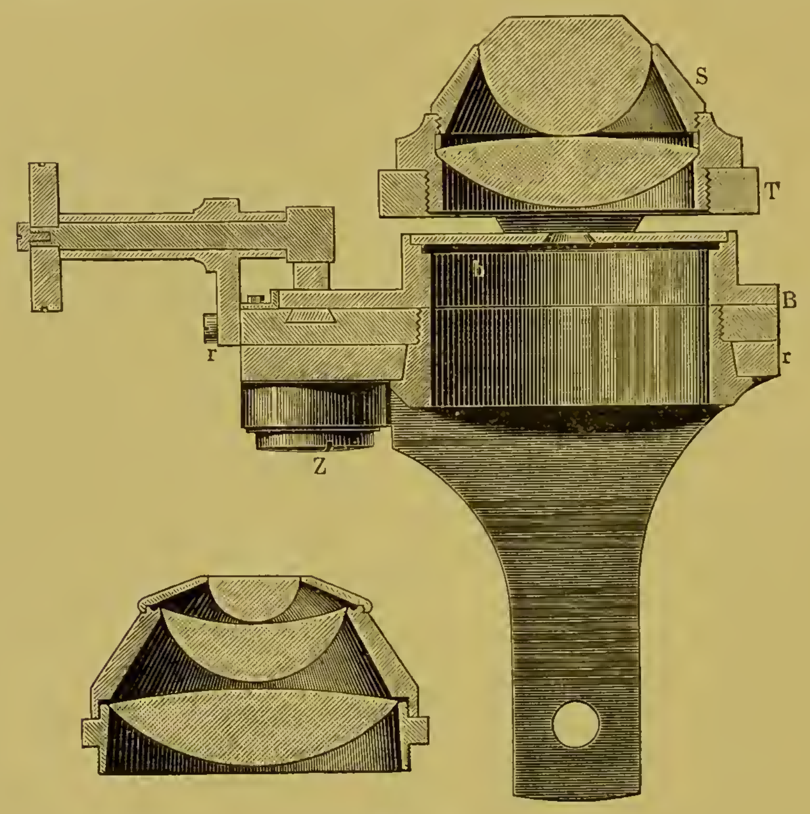


Fig. 46.

répondant aux besoins les plus divers est, à notre avis, le condenseur d'Abbe et celui de Nachet. Essentiellement, le condensateur d'Abbe (fig. 45 et 46) est formé d'un système de lentilles S à grande ouverture (ouverture num. 1,20 et 1,40),

de deux miroirs S*p*, l'un plan et l'autre concave; d'un porte-diaphragme B avec une série de diaphragmes. Les lentilles sont vissées sur un anneau T fixe. Sur un second anneau *r*, placé inférieurement, est disposé le porte-diaphragme; toute cette partie tourne autour de *z*, de façon à être amenée hors de l'axe optique.

L'appareil est fixé dans une glissière sous la platine : au niveau de celle-ci arrive exactement le plan de la lentille supérieure hémisphérique.

On amène hors de l'axe le porte-diaphragme quand on veut changer les pièces qu'il contient. On replace, ensuite, le tout dans la position ordinaire.

Le porte-diaphragme peut accomplir non seulement une révolution entière sur lui-même suivant l'horizontale (comme une platine tournante), mais encore, suivant cette direction, il peut glisser par l'intermédiaire d'une crémaillère qui est visible dans la figure. La virole *g* commande cette crémaillère; un ressort fait arrêt quand le diaphragme occupe exactement la position centrale. Cette disposition a une importance capitale.

La figure 46 représente le condenseur d'Abbe en coupe transversale passant par la virole (voir en même temps fig. 45). Les deux lentilles S, dont la supérieure est hémisphérique, sont combinées par une ouverture numérique de 1,20; avec les trois lentilles représentées à gauche, cette ouverture est de 1,40. T est l'anneau où les verres condenseurs s'adaptent; *b* représente un diaphragme; au centre se voit l'ouverture.

Sur *rr* glisse le porte-diaphragme quand on le meut par l'intermédiaire de la virole.

La figure 47 représente l'appareil d'Abbe tel que le construit Verick; le miroir B se meut suivant l'axe E; on l'amène ainsi facilement en avant; tout l'instrument est mobile de haut en bas par une crémaillère que met en mouvement la virole A. Le porte-diaphragme est amené au

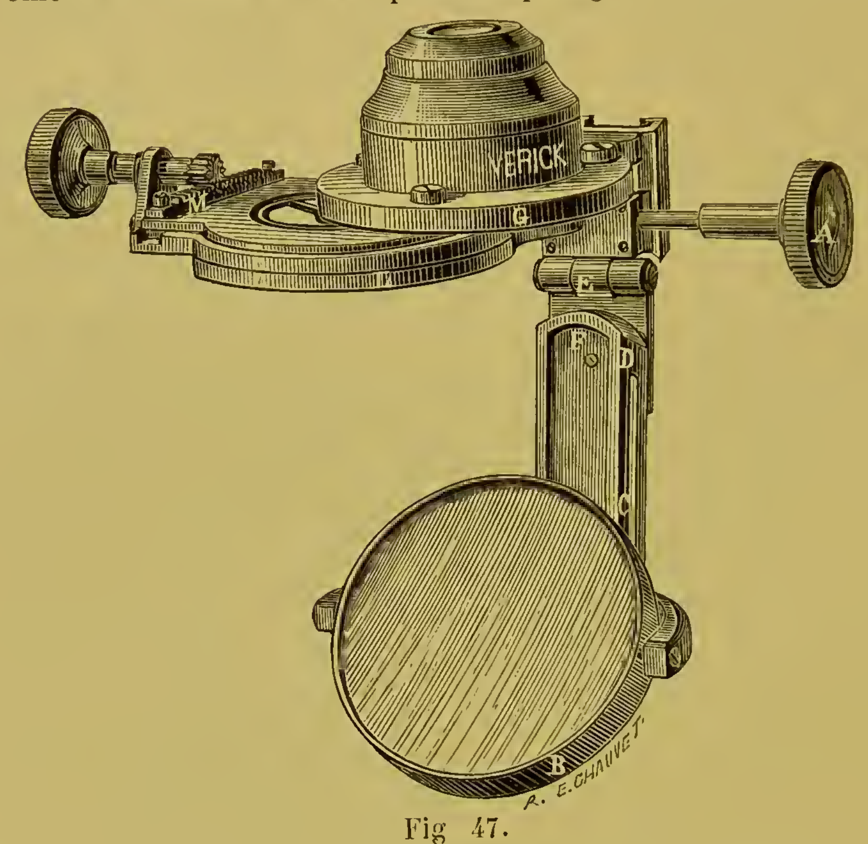


Fig 47.

dehors pour en montrer la construction. M représente la crémaillère qui permet de donner toutes les positions au diaphragme. La lumière centrale est obtenue par la position ordinaire de l'appareil, l'ouverture des diaphragmes se trouvant alors exactement dans l'axe de l'instrument. En faisant mouvoir la virole, la lumière devient d'autant plus oblique que l'ouverture du diaphragme est plus écartée.

Pour les observations ordinaires, quand les éléments sont visibles par des différences de capacité de réfraction et non par une absorption inégale, on se sert du diaphragme le plus étroit; la lumière est alors suffisante.

Pour les préparations teintées, et surtout pour les bactéries, on employera avantageusement les grands diaphragmes, ou même on les supprimera tout à fait *(méthode de Koch)*.

Le diaphragme étoilé est mis en usage quand on veut faire des observations sur champ noir; il doit occuper alors la position centrale; quand on le peut, on amoindrira pour de telles observations l'angle d'ouverture des objectifs en introduisant entre l'entonnoir et les lentilles du système des plaques percées d'une ouverture circulaire (1).

Avec des diaphragmes dont l'ouverture très étroite se trouve à la périphérie de la plaque, il est possible d'obtenir des rayons monochromatiques. On peut, par ce moyen, résoudre de fines structures plus facilement qu'à la lumière blanche.

Pour les opérations délicates avec les immersions, on unit optiquement le condensateur à la préparation par l'intermédiaire d'une goutte d'eau, de glycérine ou d'huile; on utilise ainsi les faisceaux lumineux qui, sans cela, atteindraient l'angle limite et seraient ainsi totalement réfléchis dans l'air (voir Théorie de l'ouverture, page 47).

Le miroir plan est ordinairement mis en usage. Pour les faibles grossissements, on se sert du miroir concave. Dans ce dernier cas, si la lumière est trop intense, on place les plus petits diaphragmes. Avec la lumière d'une lampe, on

(1) Zeiss fournit des diaphragmes avec ses objectifs.

interposera entre celle-ci et le miroir un ballon d'un 1/2 à 1 litre de capacité rempli d'eau, ce qui constituera une lentille dont on projettera la lumière venant de la lampe sur le miroir. (Employer une dissolution de sulfate de cuivre ammoniacal si l'on veut l'éclairage monochromatique.)

L'appareil d'Abbe produit tous les effets de l'éclairage central et oblique; il donne les mêmes résultats qu'une platine tournante. Dans les journées nébuleuses, alors que le miroir seul ne fournit pas assez de lumière pour les forts grossissements, le condensateur que nous venons de décrire permet encore de faire des observations. Il est avantageusement employé avec la lumière polarisée et avec la chambre noire pour photographier.

Comme nous l'avons dit, Zeiss construit deux systèmes de lentilles condensatrices; l'une à trois verres convergents de 1.40 d'ouverture numérique; l'autre à deux lentilles dont l'ensemble a 1.20 d'ouverture. La première disposition est utile avec les objectifs homogènes à très grandes ouvertures.

DU POUVOIR RÉSOLVANT OBTENU PAR DIFFÉRENTS ÉCLAIRAGES.

Avec la lumière monochromatique obtenue, soit par un appareil spécial, soit par des diaphragmes à ouverture excentrique de l'appareil d'Abbe, soit encore par les rayons lumineux passant à travers des dissolutions colorées, on augmente d'une façon très notable le pouvoir résolvant; il importe de connaître l'essence de ce phénomène, afin d'en tirer plus sûrement parti dans la pratique. Pour arriver à ce but, nous sommes obligé de rentrer dans les questions théoriques

qui ont été traitées antérieurement; il faut également, parce que ces choses sont connexes, que nous montrions comment il se fait que par la photographie, on peut résoudre de fines structures que l'œil est impuissant à découvrir.

Abbe a établi la formule :

$$\delta = \frac{\lambda}{2a} \quad (1)$$

dans laquelle δ représente la distance entre deux lignes ou deux éléments consécutifs à résoudre; λ = la longueur d'ondulation (1) et $2a$ est le double de l'*ouverture numérique* d'un objectif. Si l'on sait quelle est la distance entre deux lignes consécutives, il sera bien facile de calculer combien l'objectif dont il s'agit pourra résoudre de ces éléments par millimètre ou par pouce; il suffira de diviser le millimètre ou le pouce par la valeur de δ.

En prenant la longueur d'onde pour la bande E *(lumière blanche)* du spectre 0,0005269 mm. ou 0,5269μ, on aura :

$$\delta = \frac{0{,}5269}{2a} \quad (2)$$

Dans la lumière monochromatique donnée par la bande F *(rayons violets)* du spectre où la valeur d'une ondulation est 0,4861μ, on obtiendrait :

$$\delta' = \frac{0{,}4861}{2a} \quad (3)$$

Enfin, en prenant 0,4000μ pour la valeur de la longueur

(1) Voir la théorie de la formation des images microscopiques, qui a été exposée antérieurement.

d'onde dans la bande h où se trouvent les rayons chimiques, on aurait :

$$\delta'' = \frac{0,4000}{2a} \quad (4)$$

La valeur δ est plus grande que δ'; par conséquent, en divisant un pouce anglais ou un millimètre (pour avoir la valeur du pouvoir résolvant) par δ, nous obtiendrons une valeur moindre qu'en divisant la même quantité par δ'; il en serait encore ainsi si l'on prenait pour diviseur δ''.

D'où nous voyons que dans la lumière monochromatique et dans les rayons chimiques, le pouvoir résolvant est plus grand que dans la lumière blanche.

Ce qui précède nous apprend que, connaissant l'ouverture numérique d'un objectif, la longueur de l'ondulation en fraction de millimètre, pour trouver la valeur du pouvoir résolvant (en lignes ou éléments par mm. ou par pouce), il suffit de diviser le millimètre ou la valeur du pouce (exprimée en mm.) par la fraction obtenue en prenant pour numérateur la valeur de l'ondulation, et pour dénominateur l'ouverture numérique ; or, diviser par cette dernière fraction, c'est multiplier par cette fraction renversée ; on aurait ainsi, en prenant pour valeur du pouce anglais 25399 millièmes de millimètre (μ) :

$25399 : \frac{0,5269}{2a} = 25399 \times \frac{2a}{0,5269}$ pour la lumière blanche.

$25399 : \frac{0,4861}{2a} = 25399 \times \frac{2a}{0,4861}$ pour la lumière monochromatique (bleu).

$25399 : \frac{0,4000}{2a} = 25299 \times \frac{2a}{0,4000}$ pour les rayons agissant efficacement sur la plaque photographique.

Supposons, pour fixer les idées, que l'on veuille trouver le pouvoir résolvant, dans les diverses conditions qui précèdent, d'un objectif à sec ayant 95° 28′ d'ouverture angulaire, soit 0,74 d'ouverture numérique (la table de Stephenson nous donne cette indication); si nous voulons connaître cette valeur en nombre de lignes résolues par pouce anglais, il suffira de multiplier le pouce anglais exprimé en millimètres par : $\frac{0,74 \times 2}{0,5269}$ pour la lumière blanche, $\frac{0,74 \times 2}{0,4861}$ pour la lumière bleue (F) et $\frac{0,74 \times 2}{0,4000}$ pour les rayons chimico-photographiques.

Connaissant par la table de Stephenson les valeurs de pouvoir résolvant depuis 1,52 jusque 0,50 d'ouverture numérique dans la lumière blanche (1), comme ces pouvoirs sont en raison inverse des longueurs d'onde, pour passer à la lumière monochromatique ($\lambda = 0,4861$), il suffira de multiplier le nombre de lignes par $\frac{0,5269}{0,4861}$; cela revient à multiplier par 1,084.

De même pour obtenir le pouvoir résolvant des rayons chimico-photographiques, on multiplierait le nombre de lignes de la table par $\frac{0,5269}{0,4861}$; ce qui revient à multiplier par 1,317.

Exemple : le pouvoir résolvant pour la lumière blanche d'un objectif de 0,74 d'ouverture numérique est 71.336 (par pouce); pour obtenir le même pouvoir dans la lumière monochromatique (violet), il suffira de faire les calculs suivants :

$$71.336 \times 1,084 = 74760.$$

(1) Au besoin, on chercherait ces nombres à l'aide de la formule que nous avons indiquée.

Dans les mêmes conditions, pour obtenir le pouvoir résolvant photographique, connaissant ce pouvoir pour la lumière blanche, il suffirait d'effectuer les opérations suivantes :

$$71.336 \times 1,317 = 93849.$$

Nous croyons avoir établi d'une façon suffisante tout le parti que l'on peut retirer de l'emploi de la lumière monochromatique si facile à obtenir comme nous l'avons indiqué plus haut.

Nous pensons que jusqu'à ce moment, dans les laboratoires, on a eu le grand tort de négliger les moyens, tels que ceux qui nous occupent, pour augmenter l'efficacité des objectifs.

Nous croyons avoir démontré suffisamment que la photographie peut nous donner des résultats plus précis que la vue ordinaire.

CHOIX ET ESSAI DES OBJECTIFS.

Pour aborder l'étude de l'histologie et de l'anatomie comparée, des objectifs donnant des grossissements de 80 à 600 diamètres suffisent amplement. On choisira donc, dès le début, deux systèmes, l'un de 1/2, l'autre de 1/6 pouce de foyer ; ce qui correspond :

Au nº 2 et 6 de Verick.
Au nº 4 et 7 de Nachet.
Au nº B et D de Zeiss.
Au nº II et V*a* de Seibert.
Au nº 4 et 7 de Leitz.
Au nº 3 et 7 de Reichert.
Au nº 4 et 7 de Hartnack.

TABLE DE STEPHENSON

Cette table donne l'ouverture numérique correspondant aux angles d'objectifs à sec, à eau et à l'huile; le pouvoir résolvant est indiqué en regard en prenant pour base la ligne E du spectre.

	OUVERTURE NUMÉRIQUE ($a = n \sin u$)	ANGLE D'OUVERTURE ($2u$)			POUVOIR ÉCLAIRANT a^2 (Ajoutée par Crisp)	POUVOIR RÉSOLVANT EN LIGNES CONTENUS DANS UN POUCE ($\lambda = 0{,}5269$)	POUVOIR PÉNÉTRANT $\left(\frac{1}{a}\right)$
		OBJECTIFS A SEC $n = 1$	IMMERSION A EAU $n = 1.33$	IMMERSION HOMOGÈNE $n = 1.52$			
	1	2	3	4	5	6	7
Maximum d'ouverture de l'homogène immersion avec un cover de crown-glass	1.52	»	»	180° 0′	2.310	146,528	.658
	1 50	»	»	161° 23′	2.250	144,600	.667
	1.48	»	»	153° 39′	2.190	142,672	.676
	1.46	»	»	147° 42′	2.132	140,744	.685
	1.44	»	»	142° 40′	2 074	138,816	.694
	1.42	»	»	138° 12′	2.016	136,888	.704
	1.40	»	»	134° 10′	1.960	134,960	.714
	1.38	»	»	130° 26′	1.904	133,032	.725
	1.36	»	»	126° 57′	1.850	131,104	.735
	1 34	»	»	123° 40′	1.796	129,176	.746
Maximum d'ouverture de l'immersion à l'eau.	1.33	»	180° 0′	122° 6′	1 770	128,212	.752
	1.32	»	165° 56′	120° 33′	1.742	127,248	.758
	1.30	»	155° 38′	117° 34′	1.690	125.320	.769
Homogène 1/8, 1/12, 1/18 de Zeiss. . .	1.28	»	148° 20′	114° 44′	1.638	123,392	.781
	1.26	»	142° 39′	111° 59′	1.588	121,464	.794
	1.24	»	137° 36′	109° 20′	1.538	119,536	.806
	1.22	»	133° 4′	106° 45′	1.488	117,608	.820
	1.20	»	128° 55′	104° 15′	1.440	115,680	.833
Test de Nobert, 19 bandes	1.18	»	125° 3′	101° 56′	1.392	113,752	.847
	1.16	»	121° 26′	99° 29′	1.346	111,824	.862
	1.14	»	118° 00′	97° 11′	1.300	109,896	.877
	1.12	»	114° 44′	94° 56′	1.254	107,968	.893
	1.10	»	111° 36′	92° 43′	1.210	106,040	.909
	1.08	»	108° 36′	90° 33′	1.166	104,112	926
	1.06	»	105° 42′	88° 26′	1.124	102,184	.943
	1.04	»	102° 53′	86° 21′	1 082	100,256	.962
	1.02	»	100° 10′	84° 18′	1.040	98,328	.980
Maximum de l'ouverture d'un objectif à sec	1.00	180° 0′	97° 31′	82° 17′	1.000	96,400	1.000
	0.98	157° 2′	94° 56′	80° 17′	.960	94,472	1.020
Amphipleura pellucida = 92,000 à 93,000.	0.96	147° 29′	92° 24′	78° 20′	.922	92,544	1.042
	0.94	140° 6′	89° 56′	76° 24′	.884	90 616	1.064
	0.92	133° 51′	87° 32′	74° 30′	.846	88,688	1.087
	0.90	128° 19′	85° 10′	72° 36′	.810	86,760	1.111
	0.88	123° 17′	82° 51′	70° 44′	.774	84,832	1.136
	0.86	118° 38′	80° 34′	68° 54′	.740	82,904	1.163
Objectif E et F de Zeiss 80,976	0.84	114° 17′	78° 20′	67° 6′	.706	80,976	1 190
Navicula crassinervis 78,000 à 87,000. .	0.82	110° 10′	76° 8′	65° 18′	.672	79,048	1.220
	0 80	106° 16′	73° 58′	63° 31′	.640	77,120	1.250
	0.78	102° 31′	71° 49′	61° 45′	.608	75,192	1.282
	0.76	98° 56′	69° 42′	60° 0′	.578	73,264	1.316
	0 74	95° 28′	67° 36′	58° 16′	.548	71,336	1.351
	0.72	92° 6′	65° 32′	56° 32′	.518	69,408	1.389
Surirela gemma 64,000 à 690,000 . . .	0.70	88° 51′	63° 31′	54° 50′	.490	67,480	1.429
	0.68	85° 41′	61° 30′	53° 9′	.462	65,552	1.471
	0.66	82° 36′	59° 30′	51° 28′	.436	63,624	1.515
	0.64	79° 35′	57° 31′	49° 48′	.410	61,696	1.562
	0.62	76° 38′	55° 34′	48° 9′	.384	59 768	1.613
Objectif D de Zeiss 57,840	0.60	73° 44′	53° 38′	46° 30′	.360	57,840	1.667
	0.58	70° 54′	51° 42′	44° 51′	.336	55,912	1.724
	0.56	68° 6′	49° 48′	43° 14′	.314	53,984	1.786
	0.54	65° 22′	47° 54′	41° 37′	.292	52,056	1.852
	0.52	62° 40′	46° 2′	40° 0′	.270	50,128	1.923
Pleurosigma angulatum	0.50	60° 0′	44° 10′	38° 24′	.250	48,200	2 000

Quand le maniement du microscope sera connu, et que l'on possédera les premiers éléments de la technique histologique, on se procurera, chez un opticien renommé, un objectif à immersion à eau de 1/15 de pouce environ.

Remarquons qu'il n'est pas nécessaire d'acquérir tous les objectifs chez le même constructeur, si l'on a soin d'exiger de la maison qui a fourni le statif, que le tube soit muni du pas de vis anglais *(Society Screw)*, chose qui n'est plus refusée, à notre connaissance, par aucun opticien ; dans tous les cas, une bague munie du pas de vis nécessaire peut servir de pièce de raccord.

Il peut très bien se faire que l'étudiant, dont le budget modeste ne lui permet pas de se procurer des instruments complets et coûteux, obtienne des combinaisons de statifs et d'objectifs de la façon la moins onéreuse. Quant aux oculaires, ils doivent provenir de la maison qui a fourni le corps du microscope. Les objectifs faibles, le 1/2 pouce, par exemple, peuvent provenir de n'importe quel constructeur un peu connu. Il n'en sera pas de même quand il s'agit des systèmes forts ; on ne saurait s'entourer de trop de renseignements, et nous engageons toujours de n'acheter qu'à la condition que les objectifs soient essayés, au préalable, se réservant le droit de renvoyer les appareils qui ne seraient pas bien conditionnés. — Le débutant fera toujours bien de s'adresser, pour l'essai des instruments, à une personne compétente.

L'essai d'un objectif repose sur la théorie qui a été antérieurement exposée. Toutefois, nous rappellerons ce qui est nécessaire pour qu'un système soit bon ; voici ces conditions :

1° Être exempt le plus possible des aberrations de sphéricité et de réfrangibilité et avoir, par conséquent, un pouvoir définissant convenable (on vérifiera si ces conditions sont remplies par le test-plaque d'Abbe);

2° Être aplanatique, par conséquent, accuser avec la même netteté, tout aussi bien au centre qu'aux bords du champ, les contours exacts des objets (test-plaque d'Abbe);

3° L'angle d'ouverture doit être en rapport avec le grossissement, comme nous l'avons exposé antérieurement. La valeur de cet angle sera vérifiée par la méthode que nous avons indiquée quand il s'agira d'objectifs à sec. — Pour les objectifs à immersion, on fera mesurer l'angle d'ouverture par une personne qui possède *l'apertomètre d'Abbe.*

La connaissance de cet angle ne suffira pas; on vérifiera expérimentalement en essayant l'objectif sur des objets connus et qui servent comme de pierre de touche aux objectifs : ces préparations types ont été appelées test-objets : telles sont les diatomées suivantes : *Pleurosigma angulatum, Surirella gemma, Amphipleura pellucida.* Toute personne s'occupant de microscopie doit posséder une bonne préparation de ces tests montée dans une substance très réfringente.

Disons, à ce propos, qu'un préjugé est répandu parmi les personnes qui s'occupent d'histologie et d'anatomie comparée. *C'est que l'examen d'une diatomée est une perte de temps.*

Nous estimons que l'étude de quelques diatomées est un exercice salutaire quand on débute dans l'art du micrographe : l'œil se forme à saisir les minimes détails et à les voir tels qu'ils sont; ensuite, on acquiert la précieuse

habitude d'apprécier la valeur de l'instrument avec lequel on travaille et, par conséquent, on arrive à connaître les limites en dehors desquelles on tomberait dans des erreurs.

Dans la première colonne de la table de Stephenson, on trouvera le nom des tests les plus employés; on verra quelle est l'ouverture numérique, quels sont l'angle et le pouvoir séparateur nécessaires pour les résoudre.

TEST-PLAQUE D'ABBE.

Ce test se compose de six lamelles argentées du côté



Fig. 47.

adhérent à une lame. L'épaisseur de ces couvre-objets est de 0,09; — 0,12; — 0,15; — 0,18; — 0,21; — 0,24.

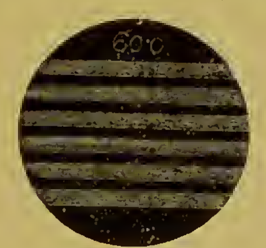


Fig. 48.

— On a tracé dans la mince couche métallique des groupes de traits parallèles.

Cette préparation sert exclusivement à examiner les

objectifs sous le rapport de leur correction de sphéricité et de réfrangibilité.

Quand il s'agit d'un objectif de grande ouverture, on mettra au point les différentes lames en examinant successivement dans la lumière centrale et dans la lumière oblique. Si les contours de l'argenture restent parfaitement visibles dans la lumière oblique comme dans la lumière centrale sans rien changer, c'est que la correction de sphéricité est complète.

Les contours ne doivent pas se montrer nébuleux et si l'on change la lumière oblique en lumière centrale, il faut qu'il ne soit pas nécessaire de mettre de nouveau au point pour obtenir la netteté des contours.

Un objectif réunissant les conditions qui précèdent sera exempt d'aberration sphérique pour l'épaisseur de chacune des lamelles du test.

Mais si les six préparations montrent des bords nébuleux ou s'il est nécessaire, en changeant la lumière oblique en lumière centrale, de remettre au point, la correction est plus ou moins incomplète. Des bords incertains et nébuleux dans la zone marginale accusent une correction trop forte de cette zone.

Le manque de netteté des contours dans les bords nébuleux est la preuve d'une correction trop faible de la zone marginale.

Différentes mises au point étant nécessaires pour la lumière oblique et la lumière centrale, il y a alors différence de niveau entre l'image des parties périphériques et centrales. Cela provient d'un manque de concours dans l'ensemble des différentes zones; la correction est alors trop forte ou trop

faible ou bien la combinaison des faisceaux lumineux se fait mal.

L'examen de la correction de réfrangibilité se fait toujours par la propriété des bords colorés qui deviennent visibles dans la lumière oblique. La correction étant suffisante, les bords de l'argenture au milieu du champ ne montreront que des bandes étroites de couleur complémentaires des spectres secondaires; c'est-à-dire, sur un côté, le jaune verdâtre; sur l'autre, le violet jusqu'au rose. Ces couleurs seront plus pures si l'aberration sphérique est parfaitement corrigée.

Un manque de netteté sur les bords du champ provient du grossissement inégal des différentes zones de l'objectif.

Les bords colorés dans la partie périphérique du champ, si l'on a une bonne correction chromatique du milieu, proviennent du grossissement inégal des images de différentes couleurs.

On a appelé à tort des imperfections de ce genre : *défauts de courbure;* elles se montrent plus ou moins avec les meilleurs objectifs quand l'angle d'ouverture est grand.

Dans les essais qui précèdent, il faut passer de la lumière centrale à la lumière oblique. On peut employer, sans doute, le miroir ordinaire; mais l'appareil d'Abbe donne de meilleurs résultats par la facilité avec laquelle on obtient les deux éclairages. Si les lignes apparaissent nébuleuses au bord du champ, tandis qu'elles sont nettes au centre ou réciproquement, c'est qu'il y a un manque de définition sur les bords, *ce phénomène étant dû à l'aberration de sphéricité*. Nous voyons une fois de plus *que la définition dépend de la correction*.

Par le test-plaque d'Abbe, on saura dans quelle limite

l'épaisseur des verres couvreurs doit être, pour que la correction reste bonne. *Dans les fines recherches, on mesurera donc, au préalable, les couvre-objets* à l'aide d'un instrument convenable. Deux modèles également bons sont fabriqués par Zeiss ; l'un est à un prix abordable ; l'autre, d'un prix plus élevé, est aussi plus élégant ; la lamelle étant placée entre deux pinces, une aiguille accuse sur un cadran gradué l'épaisseur en 0,001 de millimètre.

ESSAI DES DIFFÉRENTS SECTEURS DU CHAMP DONNÉ PAR UN OBJECTIF.

Si, par l'imagination, on partage le champ du microscope en un certain nombre de secteurs (soit, par exemple, en 4 ou en 8) pour qu'un objectif soit bon, il est nécessaire que les qualités de l'image soient les mêmes dans chacun des secteurs. En faisant tourner le tube du microscope sur lui-même ou mieux en se servant d'un ajutage qui permet la rotation de l'objectif sur lui-même, et suivant l'axe optique, il faut qu'il n'y ait aucun changement dans l'aspect de l'image pour toutes les positions autour de l'axe. On essaiera de cette façon un objectif en examinant le test-plaque d'Abbe et l'on s'assurera si les aberrations sont corrigées pour chaque secteur. Si, pendant que l'objectif tourne sur lui-même, des parties de l'image disparaissent du champ pour réapparaître ensuite, c'est qu'il y a un *défaut de centrage*.

IV

DESCRIPTION D'INSTRUMENTS.

OBJECTIFS DE ZEISS.

Zeiss, à Iéna, qui a pour conseiller le savant professeur Abbe, construit des objectifs atteignant une grande perfection; on peut dire que cet opticien occupe l'une des premières places parmi les constructeurs de microscopes non seulement du continent, mais du monde entier.

Les objectifs sont munis du pas de vis anglais; ils sont désignés par des lettres; les doubles lettres sont à grandes ouvertures; ainsi le DD a un angle de 110°, tandis que le D n'a que 74° d'ouverture angulaire.

En s'adressant à cette maison, les commençants choisiront a^3, B et D; plus tard, ils ajouteront le F; le K, le $^1/_{12}$ ou le $^1/_{18}$ compléteront la série.

Pour les travaux histologiques, nous estimons que les systèmes marqués des doubles lettres BB, CC, DD ont peu d'importance; au lieu de se procurer ce dernier objectif, il serait préférable de prendre le E ou le F qui sont à grande ouverture.

Les premiers objectifs à immersion homogène ont été construits dans les ateliers de Zeiss; c'est actuellement du continent l'opticien qui les réussit le mieux. Trois numéros

OBJECTIFS DE ZEISS.

Numéros	Ouverture numérique $a = n \sin u$	Pouvoir résolvant, nombre de lignes par pouce $\lambda = 0.5269$	Angle d'ouverture	Désignation de tests résolus par les objectifs	Longueur focale en pouce anglais	Longueur focale en mm.	Grossissement pour une longueur de tube de 1.55 mm. pour les oculaires : 1	2	3	4	5
a^1						40 mm.	7	10	15	22	
a^2						36	12	17	24	34	
a^3						28	20	27	38	52	
a^*						42-28		4-12	7-17	10-24	
aa	0.17	15.000	20°			27	20	27	36	52	70
A AA	0 20 0.31	19.282 28.923	24° 36°			18	38	52	71	97	130
B BB	0.34 0.50	32.779 48.200	40° 60°	Pleuros. angul.	2/5	11	70	95	130	175	235
C CC	0.42 0.71	40.480 67.480	50° 90°	Pleur. ang. et fasc. Idem.	1/4	7	120	145	195	270	260
D DD	0.60 0.82	71 336 79.048	75° 110°	Surirella gemma	1/6	4 3	175	230	320	435	580
E	0.85	80.976	116°	Navicula crassinerv.	1/9	2 8	270	350	490	670	890
F	0 85	80 976	116°	Idem.	1/14	1 8	405	540	745	1010	1350
G	1.15 à 1 18	109.896 à 113.752	125° à 118°	Amphip. pelluc.		3.0	260	340	470	640	855
H	Id.	Id.	Id.	»		2.4	320	430	590	805	1075
J	Id.	Id.	Id.	»		1.8	430	570	785	1070	1430
K	Id.	Id.	Id.	»		1 3	570	760	1045	1425	1900
L	Id.	Id.	Id.	»		1.0	770	1030	1415	1930	2570
1/8	1,25 à 1,30	119.000 à 125.000	137° à 155°	»	1/8	3.0 2.0	260 380	340 505	470 695	640 950	855 1265
1/12	Id.	Id.		»	1/12	1.25	605	810	1110	1515	2020
1/18	Id.	Id.		»	1/18						

sont réellement des chefs-d'œuvre ; ce sont les $^1/_8$, $^1/_{12}$ et $^1/_{18}$. Tout laboratoire de recherches bien organisé doit posséder au moins le $^1/_{12}$ et le $^1/_{18}$.

Au moment de mettre sous presse, nous apprenons qu'un verre optique nouveau a été trouvé par Zeiss et Abbe ; un subside de 25,000 marks avait été alloué par le gouvernement allemand pour les essais qui ont amené cette importante découverte ; déjà des homogènes de $^1/_{12}$ et $^1/_{18}$ ont été construits ; leur ouverture atteint 1.40.

Une série complète d'objectifs tant à sec qu'à immersion nous sera soumise incessamment ; par les premiers résultats obtenus, nous estimons que ces nouveaux systèmes construits avec le verre nouvellement trouvé auront des qualités supérieures à ce que nous connaissons actuellement. Dans l'appendice de cet ouvrage, nous aurons soin de décrire la série d'objectifs dont nous venons de parler.

STATIFS DE ZEISS.

Zeiss ne construit pas moins de seize modèles de statifs répondant à divers usages. Nous allons décrire brièvement ceux qui nous paraissent réunir les conditions pour être employés avec succès en histologie et en anatomie comparée.

Le statif I, dont le pied, en forme de fer à cheval, est à inclinaison ; la platine est tournante, de telle sorte que le corps supérieur tourne autour de l'axe optique ; le mouvement rapide se produit par une crémaillère, le mouvement lent par une vis micrométrique dont la virole porte une graduation. Le tube est à tirage ; il est, en outre, muni

d'une division en millimètres. L'éclairage se fait par l'appa-



Fig. 49.

reil d'Abbe ou par le miroir ; dans ce dernier cas, les dia-

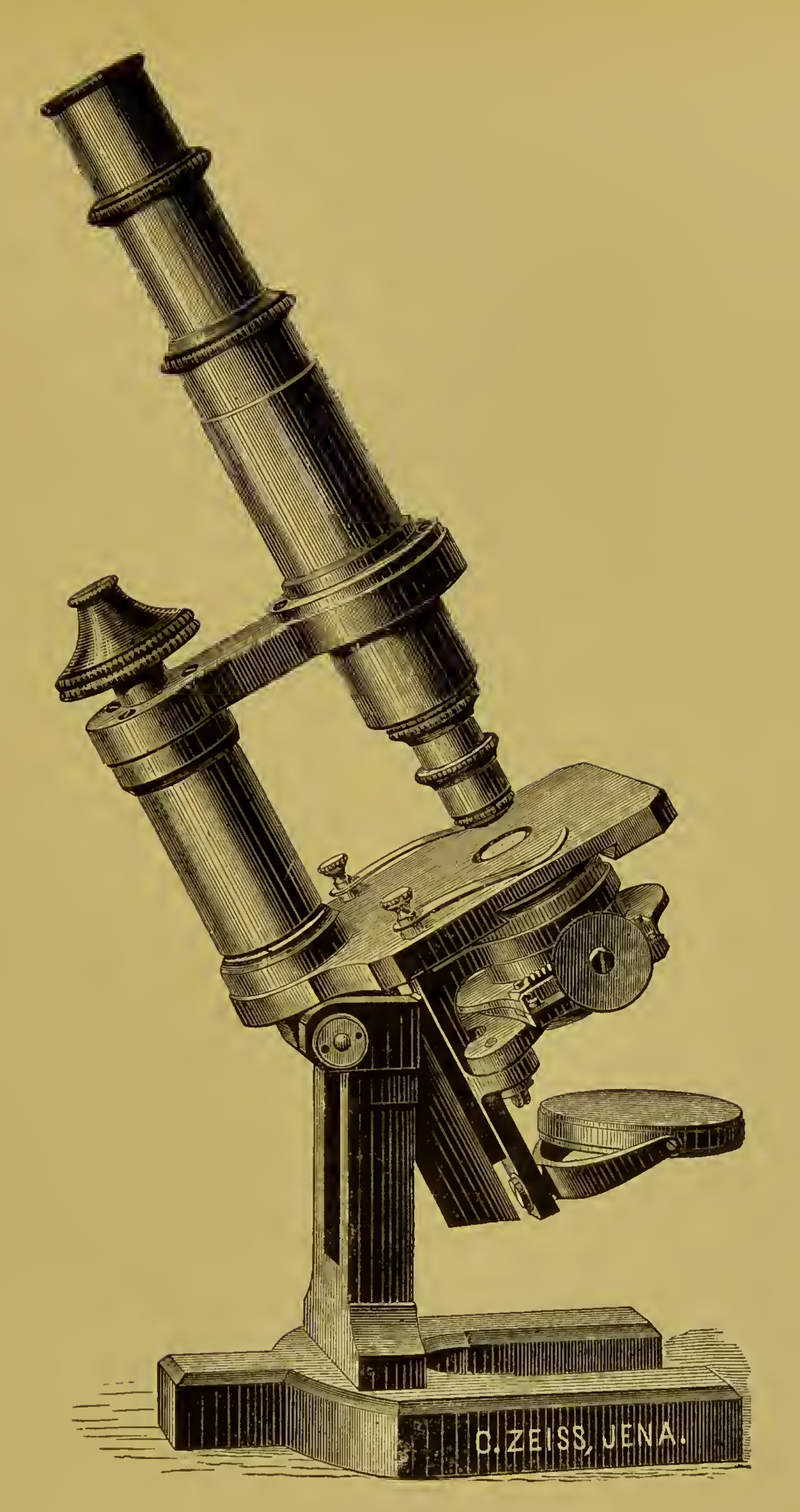


Fig. 50.

phragmes à cylindre se placent dans un *substage* (sous platine). Ce modèle, très bien construit, peut convenir, sans doute, aux amateurs fortunés. Un ou plusieurs exemplaires dans un laboratoire y rendraient certainement de grands services. Des appareils accessoires, tel que l'instrument pour la lumière monochromatique, s'y appliquent exclusivement; mais ce n'est pas l'outil qui convient à l'étudiant et au débutant. Si l'on se trouve en situation de faire l'achat d'un microscope d'un prix aussi élevé, nous estimons qu'il serait préférable de choisir, d'abord, une série de bons objectifs.

Le statif II diffère peu du précédent; les diaphragmes sont placés dans un porte-diaphragme à coulisse; il n'y a plus de substage.

Le statif IV (fig. 49), plus petit que I et II, est encore à inclinaison et à mouvement rapide par une crémaillère. La vis micrométrique est graduée; la platine est fixe; le tube est à tirage et gradué. On peut y ajouter l'appareil d'Abbe.

Statif V^{a} (fig. 50). Ce modèle, pour la forme générale, ressemble à ceux que nous venons de décrire; le mouvement rapide ne se fait plus par une crémaillère, mais il a lieu par glissement; le mouvement lent se produit par une vis micrométrique; le tube est à tirage et gradué; le porte-diaphragme est à tiroir; on peut y adapter l'appareil d'Abbe ou le miroir, suivant les besoins.

Nous estimons qu'il vaut mieux prendre ce modèle avec le condenseur que le n° IV sans condenseur.

Pour diminuer le prix, et peut-être aussi pour faciliter le travail, l'appareil d'Abbe a été modifié; les lentilles condensatrices sont facilement enlevées, quand cela est nécessaire;

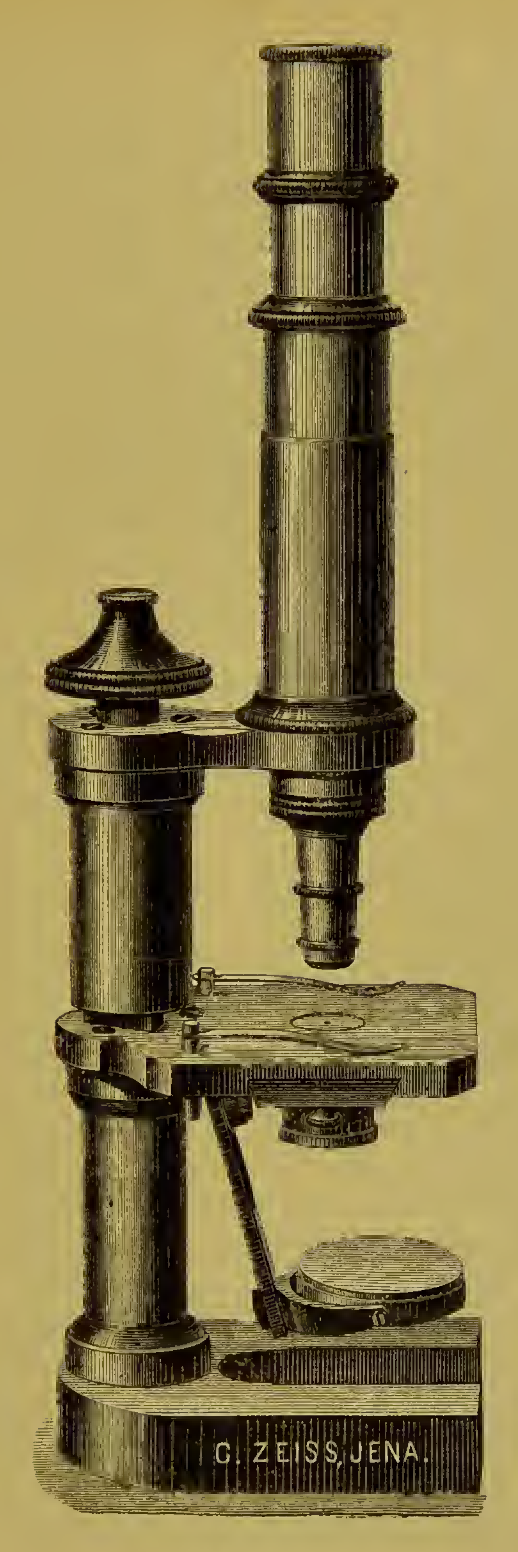


Fig. 52.

on applique alors à leur place les diaphragmes ou autres accessoires; le miroir de l'appareil donne l'éclairage. La même disposition est également réalisée aux statifs précédents pour ce qui regarde le condenseur.

Le statif V, quoique bien construit, n'a aucun avantage sur le statif VII[a]; c'est un modèle qui disparaîtra forcément des catalogues de ce constructeur.

Le statif VII[a] (fig. 52), d'une grandeur moyenne, a le pied en forme de fer à cheval; le mouvement rapide est à glissement, le mouvement lent se fait par une vis micrométrique; le porte-diaphragme est à tiroir; on peut y adapter un condenseur simplifié pour la résolution des microbes, ainsi que d'autres appareils accessoires. C'est, par excellence, le microscope de laboratoire et d'étudiant; il suffit amplement à tous les besoins ordinaires en histologie et en anatomie comparée.

Dans ces derniers temps, ce modèle a été construit à inclinaison et avec le tube à tirage; mais le porte-diaphragme n'existe pas; une plaque tournante, percée de trous, remplit le rôle de diaphragme. Nous ne sommes pas partisans de cette disposition pour les raisons que nous avons indiquées antérieurement.

Le commençant qui se croit capable d'entreprendre plus tard des études sérieuses et continues préférera le V[a]; il l'achètera, si c'est possible, muni du condenseur d'Abbe; il le ferait, en tout cas, adapter par la suite, s'il en reconnaît la nécessité. Cela ne peut avoir lieu pour le VII[a].

Le modèle VII[b] est en tout semblable au VII[a]; il en diffère par les diaphragmes, qui sont formés d'une plaque tournante percée de trous. La différence de prix de ces deux

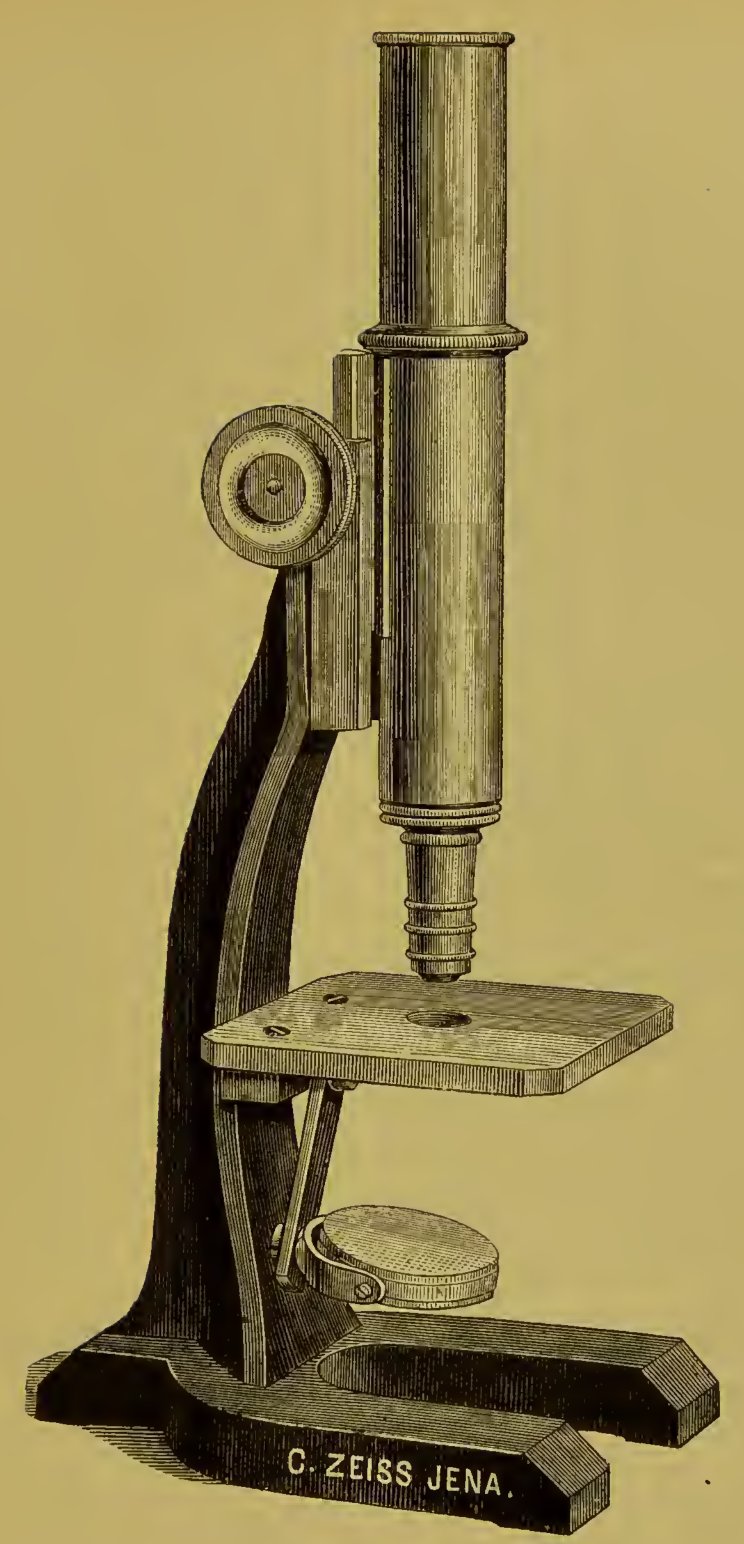


Fig. 53.

statifs est si minime que nous ne conseillerons pas l'acquisition du VII[b].

Quant aux modèles qui suivent, hormis le n° X qui est à crémaillère et sans vis micrométrique, nous n'engageons pas le lecteur à en faire l'acquisition.

Le n° X, fig. 53, ne peut servir que pour des observations avec des objectifs faibles; c'est un instrument de démonstration, rien de plus.

Quant au statif IX, avec sa platine mobile qu'une vis micrométrique fait mouvoir et qui devient ainsi oblique par rapport à l'axe optique, nous le considérons comme un instrument tout à fait démodé. S'il peut servir à l'amateur sans but, aux travailleurs sérieux il ne serait d'aucune utilité.

Zeiss construit un microscope à main très utile pour les démonstrations dans les auditoires, et avec lequel il est encore permis d'employer le D ou un objectif de $^1/_6$ de pouce de foyer; pendant l'observation, on le dirige vers la lumière.

En résumé, dans les débuts, on achètera, si l'on s'adressait à ce constructeur, les combinaisons suivantes :

Le statif V[a].	
Les oculaires 2 et 4.	
Les objectifs B et D, prix :	fr. 217,60
Avec l'appareil d'Abbe, prix :	fr. 68,80
	fr. 286,40

Le statif VII[a].
Les oculaires 2 et 4.
Les objectifs B et D,

Prix : fr. 188,70

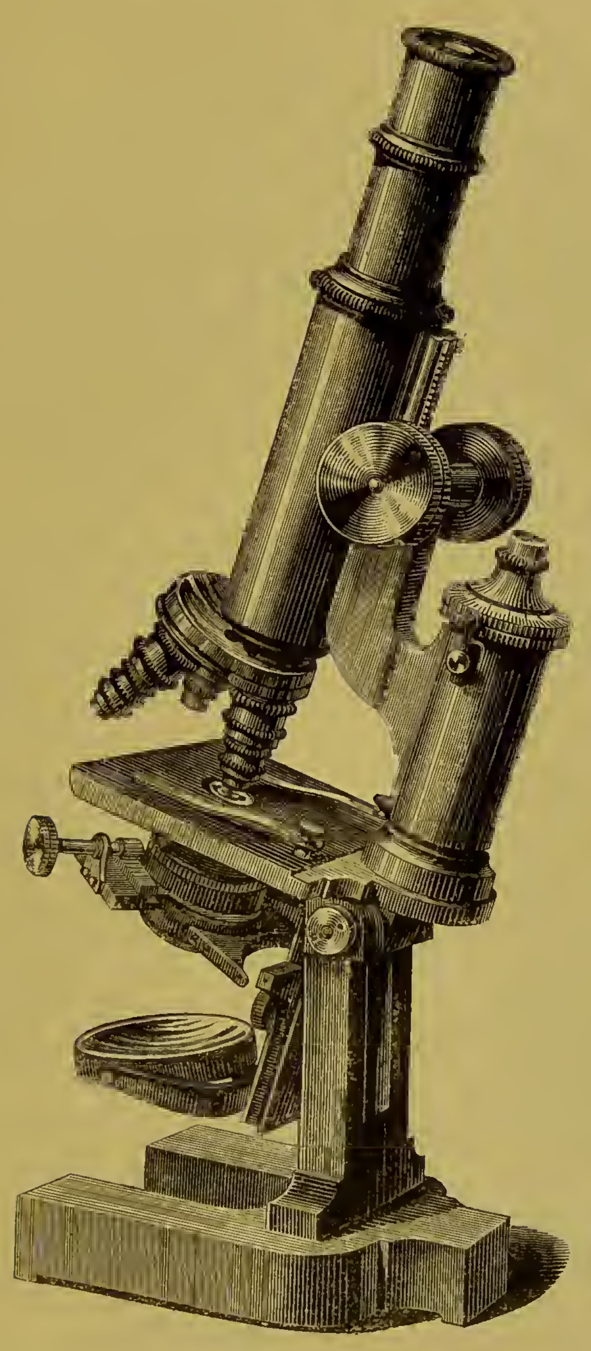


Fig. 54.

OBJECTIFS DE REICHERT.

(Bennogasse, 26, Vienne, Autriche.)

Les objectifs construits par Reichert sont excellents; tous les soins désirables sont apportés pour que les systèmes présentent les qualités de bons appareils.

Pour les débutants, les objectifs 3 ($^1/_2$ pouce) et 7 ($^1/_6$ de pouce) nous paraissent convenir. Dans la suite, on se procurera le $^1/_{15}$ à immersion à eau dont le prix (88 fr.) n'est pas élevé.

Nous avons eu entre les mains, et nous les avons essayées minutieusement, plusieurs lentilles à immersions homogènes $^1/_{15}$ de ce constructeur. Elles nous ont toutes donné des résolutions correspondant à leur ouverture numérique (1.25); nous considérons donc ces objectifs comme réunissant toutes les conditions nécessaires pour l'étude des fines structures en histologie. Le prix, 100 florins, est modéré; c'est ce qui permettra au futur micrographe d'en faire l'acquisition quand l'utilité en sera reconnue; remarquons que dans l'usage, il faut avoir soin de n'employer cet objectif qu'avec une longueur de tube de 160 à 180 millimètres pour laquelle il est corrigé.

On peut demander, en achetant les objectifs de cet opticien, le pas de vis anglais.

La correction des objectifs à monture fixe est faite pour des épaisseurs de lamelle de 0,15 à 0,18 et pour une longueur de tube de 160 à 180 millimètres.

STATIFS DE REICHERT.

Nous avons eu l'occasion d'examiner les statifs de Reichert lorsque nous avons eu l'honneur d'en faire la description à la *Société de Microscopie*. Ces instruments, tant sous le rapport mécanique que sous le rapport optique, ne laissent rien à désirer ; ils sont à la fois solides et élégants. Ils possèdent la vis anglaise et la vis continentale. Nous allons les décrire rapidement.

Le **n° I** est à inclinaison, à platine tournant autour de l'axe avec le corps supérieur ; le mouvement rapide se fait par une crémaillère et le mouvement lent par une vis micrométrique à virole graduée ; le tirage a le tube mobile gradué en millimètres, il est muni du condenseur d'Abbe avec ouverture numérique de 1.20 et de 1.40. Le porte-diaphragme cylindrique peut être élevé et abaissé par une crémaillère ; l'éclairage ordinaire est produit par un double miroir.

Le **n° II** possède tous les avantages du n° I ; il est seulement un peu plus petit et le porte-diaphragme est à coulisse. Le **n° II^b** ne tourne pas autour de l'axe (fig. 54) ; pour le reste, il est en tout semblable aux précédents ; l'examen de la figure ($^1/_2$ de la grandeur naturelle) nous dispense d'en faire une description plus complète ; remarquons que le tube est muni d'un revolver à trois objectifs.

Le **n° III** (fig. 55) est un modèle moyen ; il ne s'incline pas ; le mouvement rapide s'obtient par le glissement du tube, le mouvement lent par la vis micrométrique ; le porte-diaphragme est à tiroir ; le miroir est plan et concave. L'appareil d'Abbe s'y applique (*a*) ; on peut enlever ce dernier instrument en l'amenant par l'intermédiaire d'un

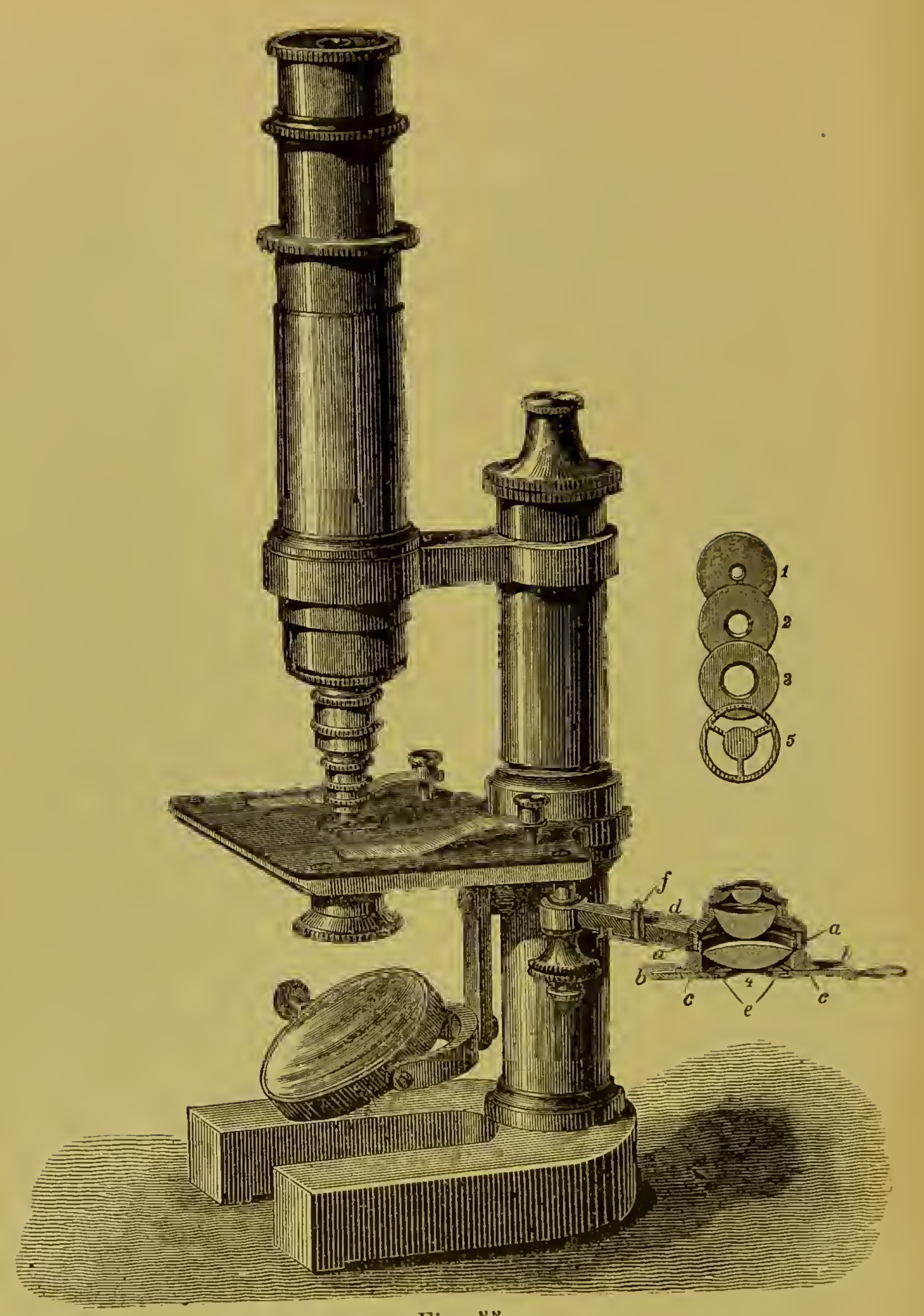


Fig. 55.

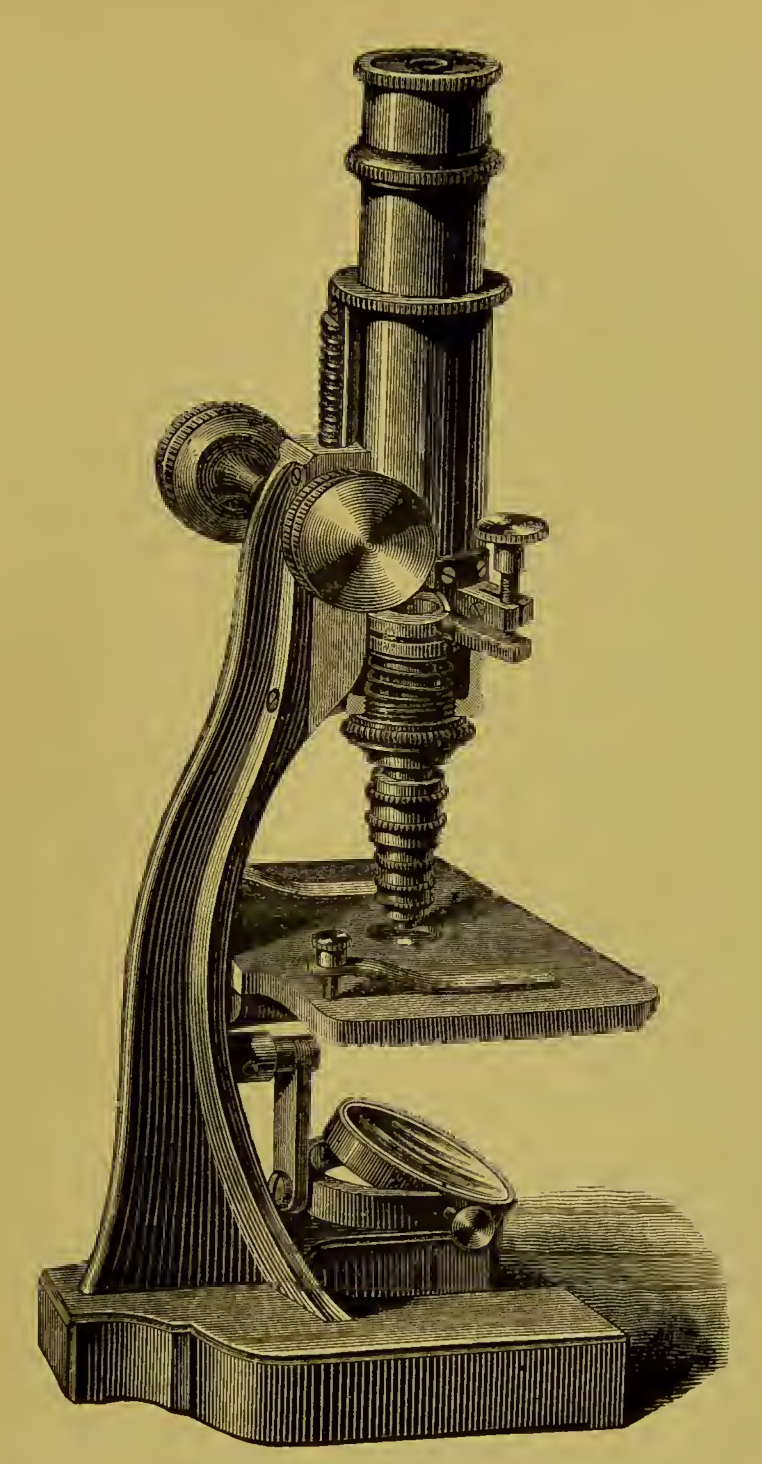


Fig. 56.

TABLEAU DES OBJECTIFS DE REICHERT.

Numéros des objectifs	Distance focale équivalente en millimètres	Distance focale équivalente en pouces anglais	Ouverture numérique	Pouvoir résolvant en lignes par pouce anglais $\lambda = 0{,}5269\ \mu$
		Objectifs à sec		
0	60.5	$2\ ^1/_2$	—	
1, 1a	40.0	$1\ ^1/_3$	—	
2	30.0	1	0.17	
3	15.5	$^1/_2$	0.34	32.779
4	9.2	$^1/_3$	0.50	48 205
5**	5 4	$^1/_4$	0.65	62 667
6**	4 3	$^1/_5$	0.77	74.236
7	2 8	$^1/_6$	0.82	79.056
7a	3.6	$^1/_6$		
8	2.2	$^1/_{10}$	0.87	83 877
8a	2.8	$^1/_9$		
9, 9*	2.0	$^1/_{12}$	0 95	91.590
		Objectifs d'immersion à l'eau		
10, 10*	1.7	$^1/_{15}$	1.10 — 1.20	De 106.051 à 115.692
11*	1 3	$^1/_{18}$		
12*	1.2	$^1/_{20}$		
15*	0.9	$^1/_{30}$		
		Immersions homogènes		
18	1.7	$^1/_{15}$	1.25 — 1.30	De 120.513 à 125.333
19	1.2	$^1/_{20}$		
20	0.9	$^1/_{30}$		

excentrique *f* sur le côté, comme on le voit dans la figure; on fixe le porte-diaphragme à tiroir comme à l'ordinaire.

On sait qu'avec l'éclairage d'Abbe, il est difficile de travailler avec les objectifs faibles, et dans un grand nombre de cas, il est d'ailleurs nécessaire d'enlever le condenseur; comme il était disposé autrefois, cette opération occasionnait une perte de temps assez longue. Le statif III de Reichert écarte cet inconvénient.

TABLEAU DES GROSSISSEMENTS OBTENUS PAR LES OBJECTIFS DE REICHERT.

Numéros des objectifs	Oculaires I	II	III	IV	V	VI orthoscopique
0	10	12	16	22	—	—
1, 1a	20	25	30	40	55	—
2	30	35	40	50	70	100
3	50	65	80	100	130	160
4	70	85	100	120	160	200
5	120	145	170	210	280	350
6	170	220	250	340	380	500
7, 7a	250	300	340	440	570	700
8, 8a	330	450	500	620	780	1000
9	430	540	620	800	1100	1400
Immersions à l'eau						
10	500	600	750	950	1250	1800
11	600	710	900	1150	1500	2500
12	740	860	1150	1500	1900	3000
15	1050	1200	1500	2000	2500	4000
Immersions homogènes						
18	500	600	750	950	1250	1800
19	740	860	1150	1500	1900	3000
20	1050	1200	1500	2000	5000	4000

Les diaphragmes 1, 2, 3, 5 se placent dans l'ouverture de la pièce *bb* en *c*.

Le même instrument peut être construit avec crémaillère pour le mouvement rapide et à inclinaison.

Le *statif III*[a], pour étudiant, à mouvement rapide produit par le glissement du tube et à mouvement lent par une vis micrométrique, possède des diaphragmes formés par une plaque tournante; le tube est à tirage.

Le statif IV, pour étudiant, est semblable au précédent;

il est plus petit; c'est avec ce modèle que sont fournis les objectifs à petite ouverture.

Un microscope, pour étudiant et pour débutant (n° VII, fig. 56), est formé d'un pied et d'une colonne en fonte; la table est munie de diaphragmes à plaque circulaire.

Le mouvement rapide est produit par une crémaillère

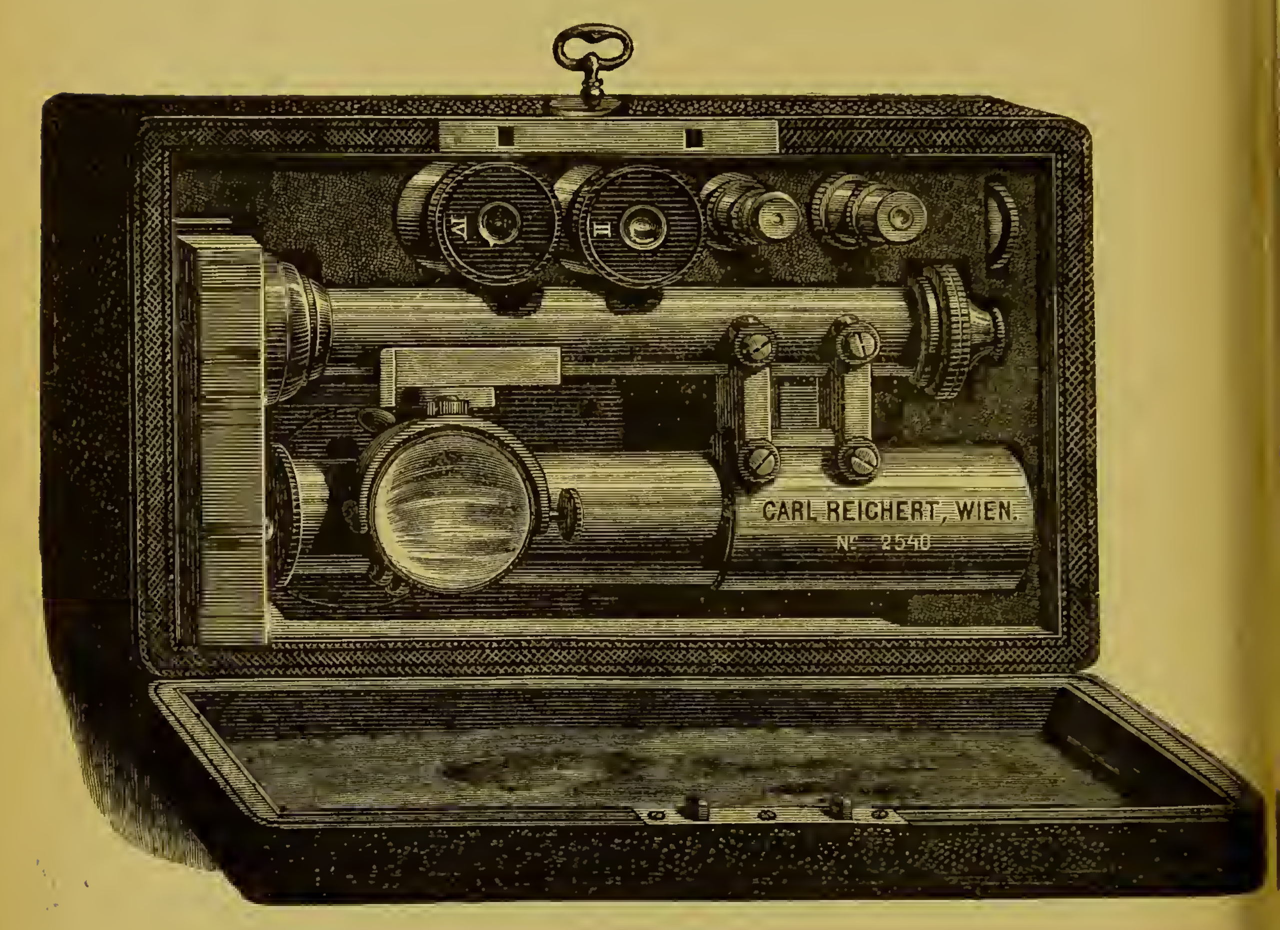


Fig. 57.

commandée par une roue dentée à laquelle est adaptée une double virole.

Le mouvement lent est obtenu par une vis micrométrique

très précise, pareille à celle des grands statifs anglais; la pièce mobile sur laquelle se fixent les objectifs est taillée en prisme, ce qui assure l'instrument contre le décentrage.

Le tube est à tirage. L'instrument est muni de deux miroirs, l'un plan, l'autre concave.

Avec les objectifs 3, 5 et 8, à *petit angle* d'ouverture, et deux oculaires, l'instrument se vend 60 florins.

L'objectif 8 résout une catégorie de lignes du *Pleurosigma angulatum* dans la lumière oblique.

Nous n'hésitons pas à recommander cet instrument au débutant, si ses ressources ne lui permettent pas de se procurer un instrument meilleur.

En résumé, en s'adressant à ce constructeur, on choisira l'une ou l'autre des combinaisons suivantes :

Statif III	fr. 88 (1).		
Oculaires II et V	fr. 18		
Objectif 3 ($^1/_2$ p.)	fr. 21		
Objectif 7 ($^1/_6$ p.)	fr. 37,50		
	164,50		
Appareil d'Abbe	44,00		
Statif II^b avec éclairage d'Abbe,		fr.	238,00
La même combinaison optique que plus haut,		fr.	76,50
		Fr.	314,50

Reichert construit un microscope de voyage, représenté par la fig. 57. L'instrument est disposé dans la boîte : le tube renversé et la platine rejetée au fond de l'écrin. Le mouvement rapide se fait par le glissement du tube; le mouvement lent par une vis micrométrique; le tube est à tirage et les dia-

(1) Le même modèle inclinant : 100 francs.
Le même modèle inclinant et à crémaillère : 125 francs.

phragmes se placent dans un porte-diaphragme cylindrique à tiroir (prix fr. 88).

L'immense avantage de cet instrument est de pouvoir être construit avec un condensateur d'Abbe. Le prix est alors de 130 francs.

INSTRUMENTS DE SEIBERT.

Seibert, à Wetzlar, a pris place depuis nombre d'années parmi les constructeurs consciencieux qui, par leurs efforts incessants, améliorent chaque jour leurs appareils et surtout leurs objectifs. Nous avons examiné scrupuleusement un grand nombre de lentilles de Seibert, tant à sec qu'à immersion, soit à l'eau, soit à l'huile; nous n'avons pas trouvé le moindre défaut de construction à aucun des systèmes qui nous ont été soumis à l'épreuve. Ces objectifs étaient les numéros suivants : II, III, V^b, VI^b, VI^a, VI^b; le VII^a, VII^b, VIII; — le $^1/_{16}$ et le $^1/_{20}$ (à immersion homogène).

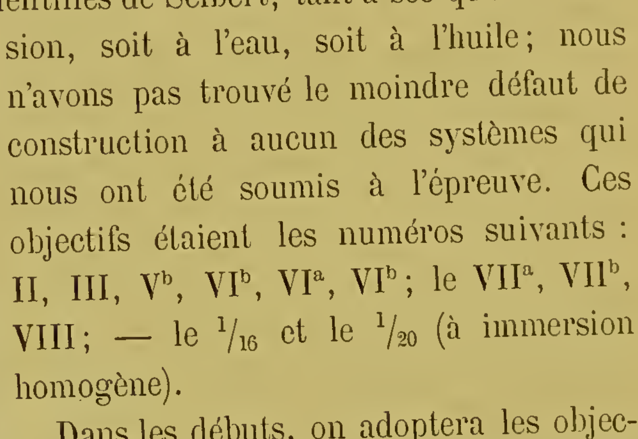


Fig. 58.

Dans les débuts, on adoptera les objectifs II ($^1/_2$ p.) et V^a ($^1/_8$ p.). — Plus tard, on se procurera le VII^b, à correction et à immersion à eau, dont le prix n'est que de 75 marks; nous nous sommes servi de cet objectif dans nos études, et nous le trouvons excellent sous tous les rapports. En cas de nécessité, on pourra prendre le même numéro VII^a), mais sans correction; il coûtera alors 60 marks.

En tenant compte de ce qui a été dit sur la longueur du tube et l'épaisseur des lamelles, cet objectif sans correction rendrait quand même tous les services du VII^b.

Quant au statif n° 6 (fig. 58), avec les objectifs II et V^a, les oculaires I et III (gros. de 70 à 610) et un micromètre, pour le prix de 148 marks (185 fr.), il convient aux commençants.

Ce statif a le pied en fer à cheval; le tube est suspendu sans friction à la Roberval; le porte-diaphragme est à tiroir; le mouvement rapide a lieu par glissement du tube, le mouvement lent, par une vis micrométrique; double miroir. Il faut avoir soin, dans la demande, d'exiger le porte-diaphragme à tiroir et non à plaque tournante, ainsi que le pas de vis anglais.

INSTRUMENTS DE NACHET.

Depuis bien longtemps, Nachet s'est fait un nom parmi les opticiens de l'Europe par l'intelligence qu'il a toujours apportée dans la construction des appareils et par un grand nombre d'inventions qu'il a réalisées.

Si la place nous manque pour décrire ici en détails tous les instruments de ce constructeur, nous nous faisons pourtant un devoir de le signaler à l'attention des futurs micrographes en rappelant que la science lui doit un grand nombre de perfectionnements utiles.

Le modèle n° 1 (fig. 59) de Nachet est un magnifique microscope inclinant pouvant devenir binoculaire; il peut rester dans toutes les positions entre l'horizontale et la verticale. Les mouvements et le centrage sont parfaits. L'ajustement au

foyer s'opère au moyen d'un mouvement rapide par l'inter-

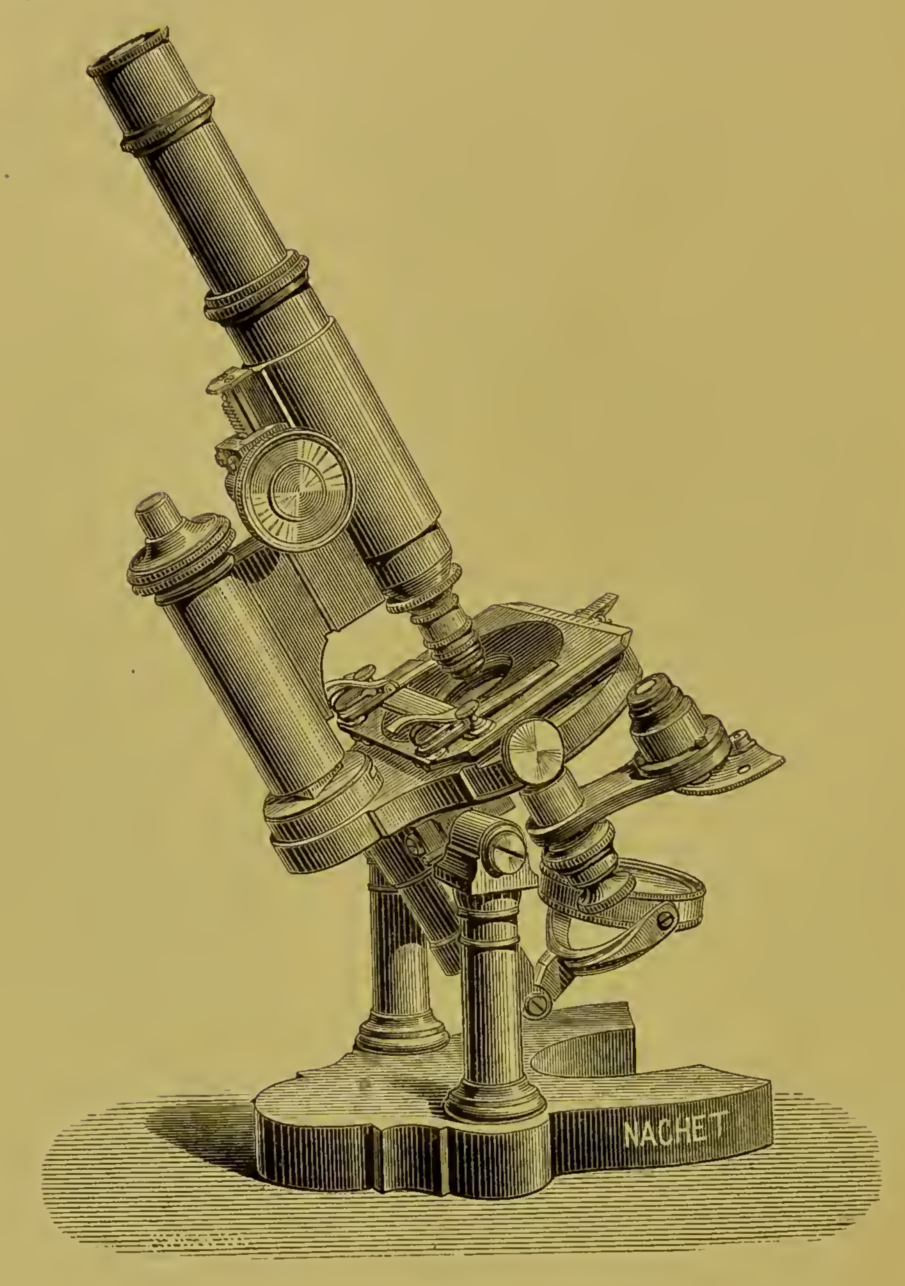


Fig. 59.

médiaire d'une crémaillère et d'un *mouvement lent* à vis

micrométrique agissant sur la colonne portant le corps. La platine est montée à rotation et est munie d'une table mobile à vis de rappel pour faire déplacer les objets sans y toucher ;

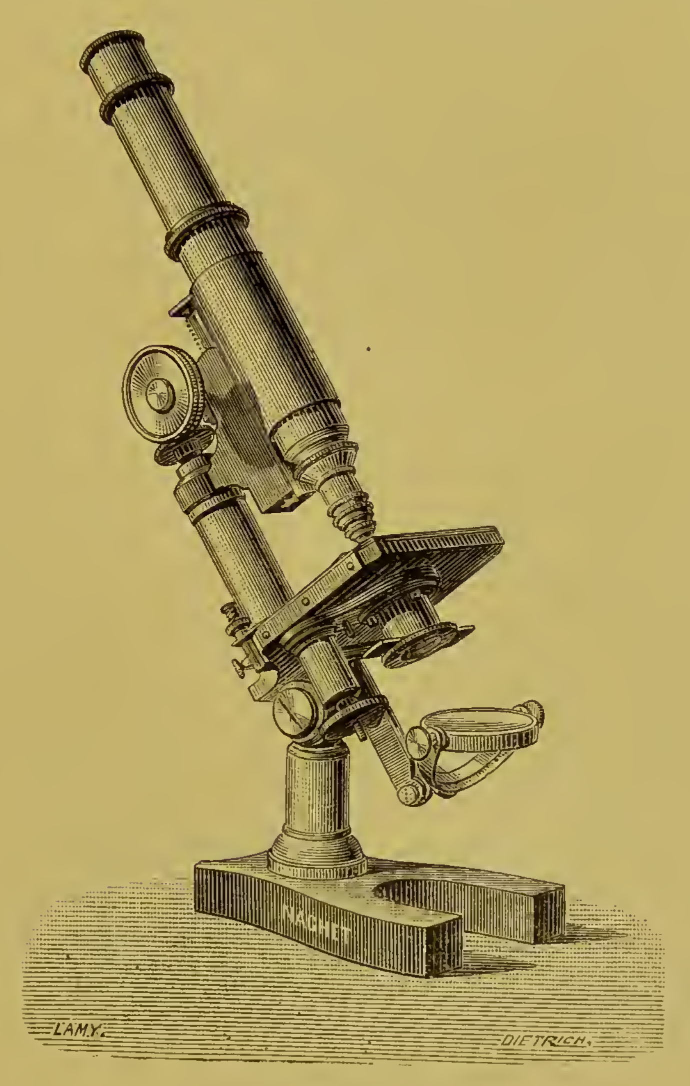


Fig. 60.

deux divisions perpendiculaires l'une à l'autre permettent de déterminer des ordonnées pour retrouver un point d'une préparation. Cette platine est garnie d'une plaque de verre

incrustée pour résister à la destruction produite par les réactifs ; l'éclairage est formé par un double miroir plan et concave monté sur articulations, pouvant se développer dans toutes les directions, afin d'obtenir les effets de la lumière oblique.

L'appareil d'éclairage de Nachet appliqué au n° 1 est basé sur le principe de la monture de l'excentrique des microscopes ordinaires de Nachet; seulement, le mouvement de mise au point, au lieu de se faire dans le tube central sous la platine, s'opère sur la colonne même autour de laquelle s'exécute la rotation.

L'intérieur de ce tube est muni d'une vis de rappel de façon qu'en plus du mouvement extérieur de rapprochement, on peut mettre très exactement au foyer l'éclairage condensateur ou le descendre d'une faible quantité pour les effets de la lumière oblique à effectuer à l'aide des ouvertures variées du diaphragme. Celle-ci passe sous l'éclairage et peut s'orienter en différents sens, étant montée sur une bague tournante déplaçant à volonté le centre de rotation du diaphragme.

Le modèle n° 2 (fig. 60) est un statif d'un aspect élégant. Le mouvement rapide se fait par crémaillère; le mouvement lent est produit par une vis micrométrique très précise, avec prisme dans la colonne.

Il est muni de l'*éclairage de Nachet,* qui a été décrit précédemment; on peut l'amener facilement hors de l'axe et le remplacer par des diaphragmes. C'est un véritable outil de travail courant.

Le microscope petit modèle (fig. 61) inclinant est sans crémaillère. Le mouvement lent est produit par une vis micro-

métrique; la colonne est emboîtée à prisme; on peut y adapter

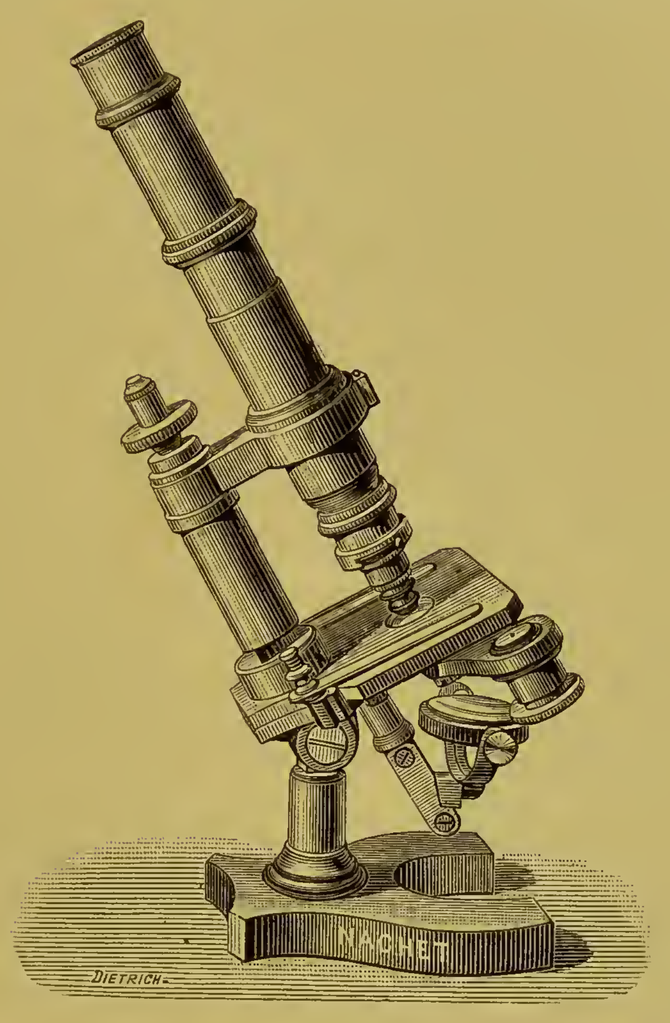


Fig. 61.

l'éclairage décrit précédemment. C'est, par excellence, le microscope du laboratoire et de l'étudiant.

MICROSCOPE DE VOYAGE DE NACHET.

De tous les microscopes de voyage, c'est celui que construit Nachet qui est le plus ingénieux et qui réunit le plus

d'avantages pratiques. Dans une boîte en maroquin, de 19 centimètres de longueur sur 11 de largeur et 6 d'épaisseur, est renfermé ce qui est nécessaire pour obtenir à volonté un microscope simple ou un microscope composé.

L'inconvénient de tous les microscopes de voyage, c'est de posséder une platine qui n'est pas stable; ce défaut est écarté dans la construction imaginée par Nachet; la table est fixe sur une colonne; celle-ci est capable de s'incliner en

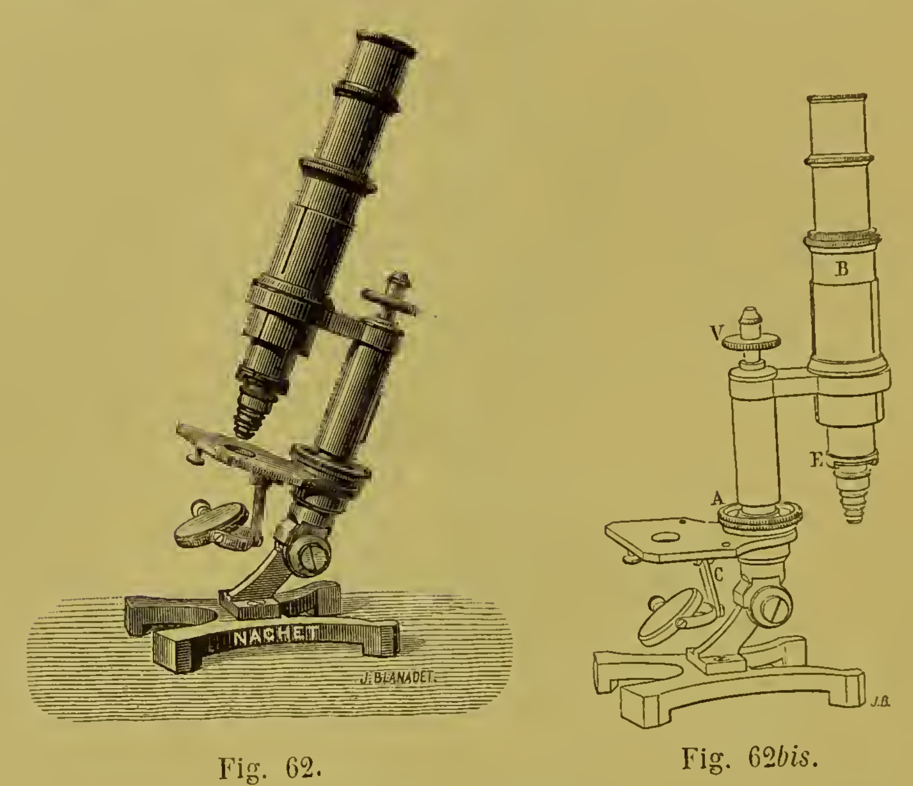


Fig. 62. Fig. 62*bis*.

accomplissant le mouvement de révolution indiqué dans la figure 63.

L'instrument, étant retiré de sa boîte, le corps inférieur a l'aspect de la figure 63; on amène la table dans la position P en lui faisant accomplir un mouvement de rotation, indiqué

par les lignes pointillées, par le moyen de la charnière O. En plaçant le bras CL qui porte les loupes, on a un microscope simple. En fixant, au lieu de ce dernier ajutage, le corps supérieur VBE (fig. 62*bis*), et en le fixant par l'anneau A, on obtient un microscope composé (fig. 62), qui ne diffère en rien des autres microscopes. Le mouvement rapide se fait par le glissement du tube B, le mouvement lent par une vis

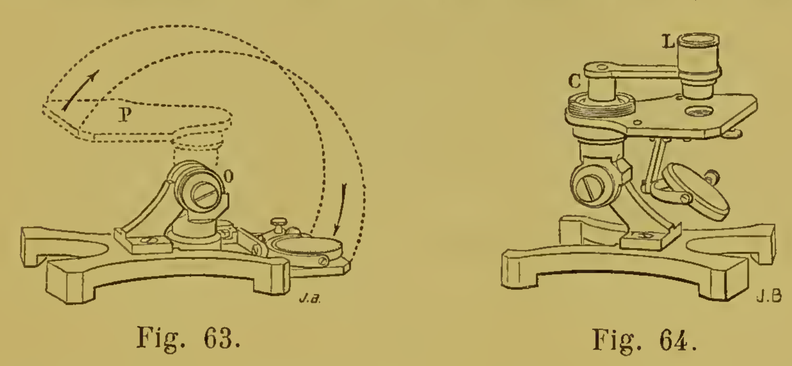


Fig. 63. Fig. 64.

micrométrique V; le tube est à tirage. Remarquons que ce modèle, ainsi construit, peut demeurer installé dans le laboratoire et servir de microscope ordinaire pour tous les travaux.

Pour replacer l'appareil dans sa boîte, on dévisse la virole A; on enlève le corps supérieur; on ramène la table dans la position qu'elle a dans la figure 63, et chaque pièce est installée dans la boîte comme on le voit dans la figure 65.

Avec un oculaire 3, les objectifs 3 (1 p.) et 6 ($^1/_7$ de p.), deux doublets pour microscope simple, ainsi que l'adaptateur qui sera décrit plus loin, le microscope de voyage coûte seulement 200 fr.

Comme microscope simple, la disposition représentée par la figure 64 est excellente pour les fines dissections, les

dilacérations, etc. Les loupes sont à grands champs, à grandes distances frontales et bien aplanatiques. Nous con-

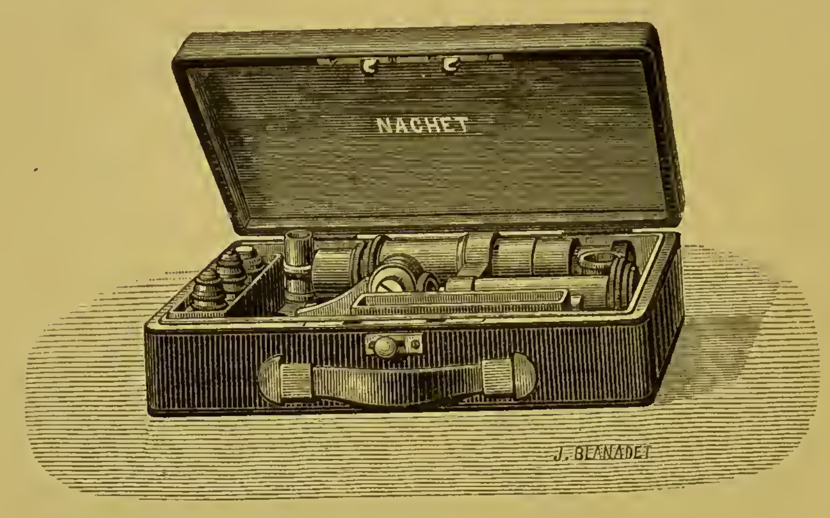


Fig. 65.

sidérons ce microscope comme un véritable chef-d'œuvre; nous nous en sommes servi souvent dans nos excursions et toujours il nous a rendu de grands services.

OBJECTIFS DE NACHET.

L'habileté de Nachet dans la construction des objectifs est connue depuis longtemps; tous les auteurs qui se sont occupés de micrographie ont été unanimes à dire le plus grand bien des lentilles de cet opticien; nous avons eu l'occasion d'en examiner souvent, et nous nous plaisons à constater que nous n'avons jamais trouvé le moindre défaut dans la construction.

Les commençants choisiront le n° 4 ($^1/_2$ pouce) et le n° 6 ($^1/_7$ de pouce); avec ce dernier, on atteint 550 diamètres avec

l'oculaire 3; il résoud avec la plus grande facilité le *Pleurosigma angulatum* dans la lumière légèrement oblique. L'ouverture est relativement grande, ainsi que la distance frontale. C'est, en somme, un excellent objectif. Plus tard, on se procurera le n° 7 à immersion à eau ($^1/_{14}$ de pouce) ou le 10 à immersion homogène. Quant au statif, on choisira le petit modèle inclinant, représenté par la figure 61, avec condenseur; si on possède les ressources nécessaires, on préférerait le modèle n° 2 représenté par la figure 60.

En cas de nécessité, on choisira un modèle moins coûteux, soit *le petit modèle droit* qui, avec les objectifs 3 et 6 et deux oculaires, est livré au prix de 135 fr.

TABLEAU DES GROSSISSEMENTS OBTENUS AVEC OCULAIRES ET OBJECTIFS DE NACHET, LE TUBE TIRÉ COMPLÈTEMENT.

Numéros des objectifs		FOYERS équivalents en pouces anglais	Oculaires			
anciens	nouveaux		1	2	3	4
	1	3	4	15	30	
0	**2**	2	30	40	60	
1	**3**	1	80	100	140	
	4	$^1/_2$	110	180	220	
2	**5**	$^1/_4$	180	260	350	
3	**6**	$^1/_7$	300	400	550	
5	**7**	$^1/_9$	390	560	780	
6	**8**	$^1/_{11}$	510	740	1000	
à immersion 7	**9**	$^1/_{14}$	650	980	1450	2100
à immersion 8	**10**	$^1/_{18}$	750	1100	1650	2600
à immersion 10	**11**	$^1/_{25}$	1150	1560	2200	3150
à immersion 11	**12**	$^1/_{40}$	1420	1860	2700	4000
Immersion homogène à correction	**9**		700	1050	1550	2250
Immersion homogène à correction	**10**		950	1300	1780	3000
Immersion homogène à correction	**11**		1250	1700	2250	3800

INSTRUMENTS DE HARTNACK.

Hartnack est un des constructeurs des plus sérieux, capable de fournir les meilleurs instruments. Les objectifs ont acquis dans les laboratoires d'histologie de notre pays une juste renommée. Dans ces derniers temps, il a été fourni à l'Université de Gand un objectif homogène qui atteint une haute perfection; M. Van Bambeke nous en a dit le plus grand bien.

Le statif VIII (fig. 66) de Hartnack, qui figure dans presque tous les laboratoires en Belgique, convient au commençant : le mouvement rapide est à glissement; le tube est à tirage; le porte-diaphragme est à tiroir. Avec les objectifs 4, 7 et 8, les oculaires 2, 3 et 4 donnent 50 à 650 diamètres; le prix est de 275 fr.; le même instrument, avec les systèmes 4, 7 et 9, ce dernier à correction et immersion, avec trois oculaires (50-1000), coûte 390 fr.

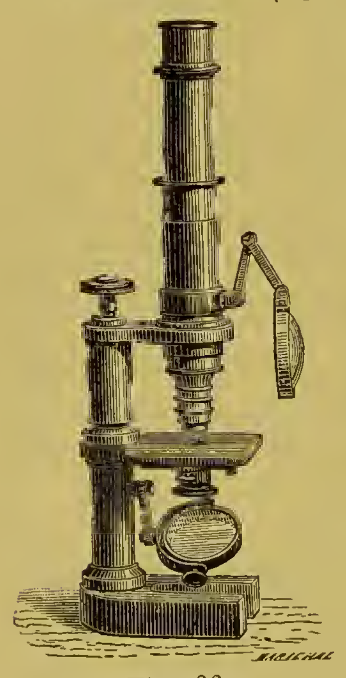


Fig. 66.

Avec un budget modeste, on diminuera le prix en ne prenant que les oculaires 2 et 4 et les objectifs 4 et 6. On aurait ainsi un tout suffisant pour débuter avec la somme de 200 fr. environ.

Le statif VIII A (fig. 67) est à crémaillère pour le mouvement rapide, à vis micrométrique pour le mouvement

lent. Il possède un appareil d'éclairage spécial avec les systèmes 4, 7 et 8 et 3 oculaires; le prix est de 375 fr. C'est une disposition excellente que l'on peut recommander à ceux qui désireraient acheter, dans le principe, un instrument complet. Le condenseur s'applique d'ailleurs également au VIII.

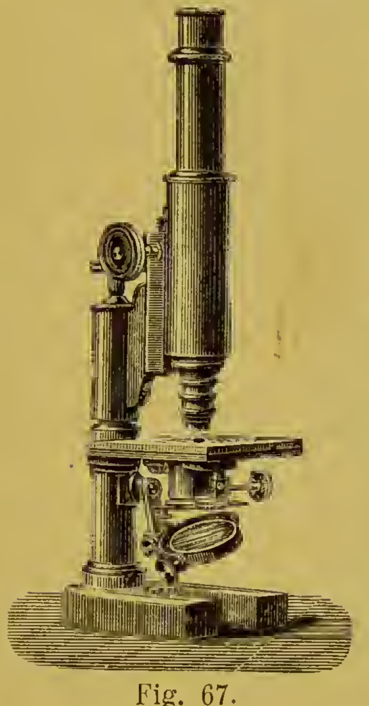


Fig. 67.

Hartnack construit son statif VIII de façon qu'il soit possible de dévisser la douille dans laquelle glisse le tube du microscope, et au lieu et place de cette douille, on visse la loupe de Brucke ordinaire; il n'est pas nécessaire ainsi d'acheter un support spécial pour cette loupe.

Les nouveaux systèmes à immersion homogène I, II, III correspondent, quant au grossissement, aux n°s 10, 11 et 13.

Les angles d'ouverture des objectifs de Hartnack sont :

N° 4	60°	
N° 5	140°	
N° 6	140°	
N° 7	155°	
N° 8	160°	
N° 9	170°	
N° 9 im.	1.15 — 1.2	ouv. num.
N° 10 im.	1.25 — 1.3	ouv. num.
N° 1 ($^1/_{12}$)	1.25 — 1.30	ouv. num.
N° 11 ($^1/_{18}$) et III	1.3	ouv. num.

TABLEAU DES OCULAIRES ET OBJECTIFS DE HARTNACK
AVEC LES GROSSISSEMENTS.

Système	FOYERS équivalents en pouces	Oculaires N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
4		40	50	65	100	—	—
7		150	220	300	450	—	—
8		250	300	400	600	800	—
9		330	430	520	850	1000	—
Système à grande ouverture							
1	2	15	20	25	—	—	—
2	1	25	30	45	—	—	—
3	3/4	50	60	80	120	—	—
4	1/2	60	70	90	140	—	—
5	1/4	100	125	160	240	—	—
6	1/5	150	180	240	350	—	—
7	1/6	200	240	300	450	600	750
8	1/9	250	300	400	600	800	1000
9	1/11	350	400	550	860	1100	1400
Système à immersion à eau							
9	1/10	410	480	630	950	1300	1500
10	1/16	520	600	750	1100	1500	1800
11	1/18	600	690	850	1250	1750	2500
12	1/21	710	820	1010	1490	2060	2800
13	1/25	820	950	1170	1730	2370	3100
14	1/30	930	1080	1340	2000	2680	3350
15	1/35	1040	1200	1500	2200	3000	3600
16	1/40	1200	1400	1750	2570	3500	4200
17	1/45	1400	1600	2000	2940	4000	4800
18	1/50	1500	1800	2230	3300	4500	5400

INSTRUMENTS DE VERICK.

Verick a acquis, en France et en Belgique, une juste renommée par la construction de ses objectifs, qui possèdent toutes les qualités optiques désirables. Le débutant choisira

le 2 et le 6, qui sont suffisants aux premières recherches. Par la suite, on se procurera un homogène à l'huile, soit

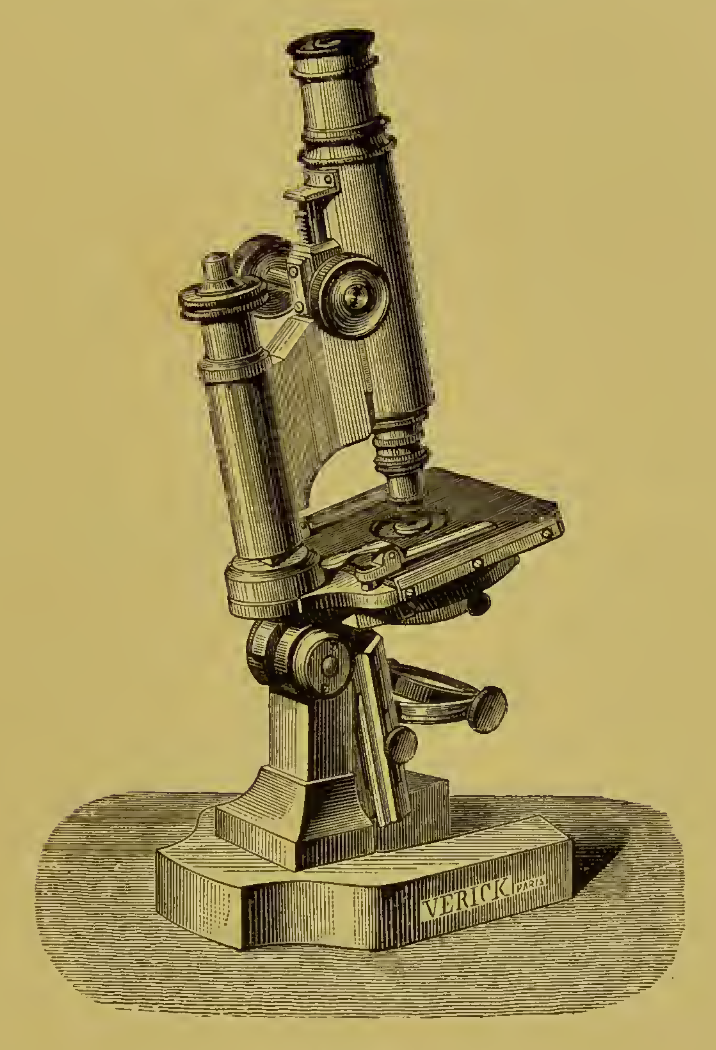


Fig. 68.

le 9 ($^1/_{12}$) ou le 10 ($^1/_{16}$). Les oculaires 2 et 4 conviennent pour les combinaisons qui précèdent.

Le microscope grand modèle (fig. 68), à platine tournante, est inclinant; le mouvement rapide a lieu par crémaillère, le

mouvement lent par vis micrométrique; le tube est à tirage; ce dernier est divisé.

Un appareil spécial est destiné à porter, avec le miroir,

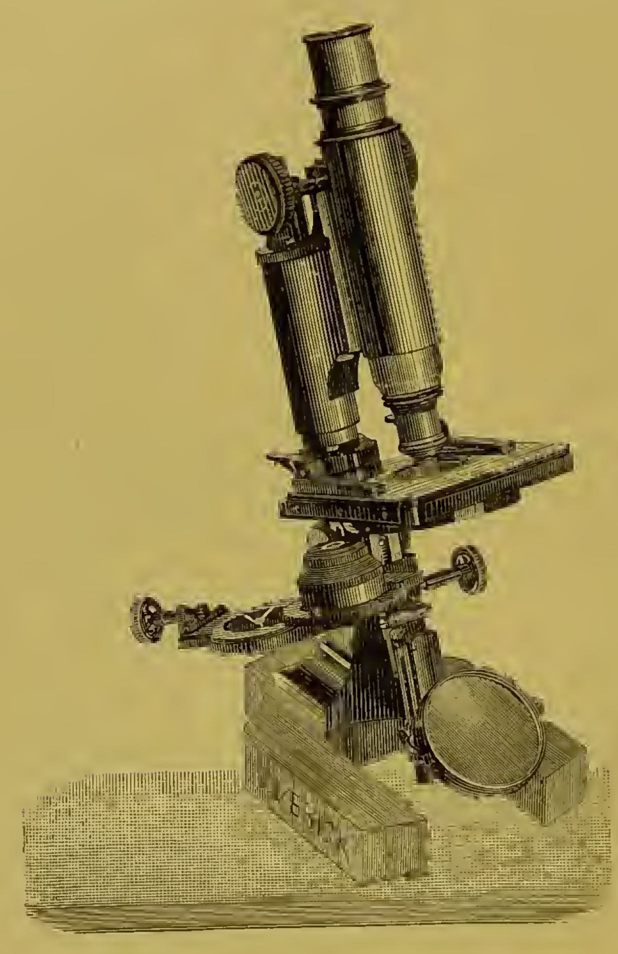


Fig. 69.

les divers diaphragmes, le condenseur et autres appareils accessoires.

Le condenseur d'Abbe s'y applique; nous l'avons décrit antérieurement. On y adapte l'appareil binoculaire.

Le modèle n° 3 (fig. 69), semblable au précédent, est un

peu plus léger; le mouvement rapide est à crémaillère, le mouvement lent à vis micrométrique.

L'appareil d'Abbe s'y adapte et les diaphragmes à cylindre s'introduisent au lieu du condenseur.

Le modèle n° 4 (fig. 70) est à inclinaison et à platine

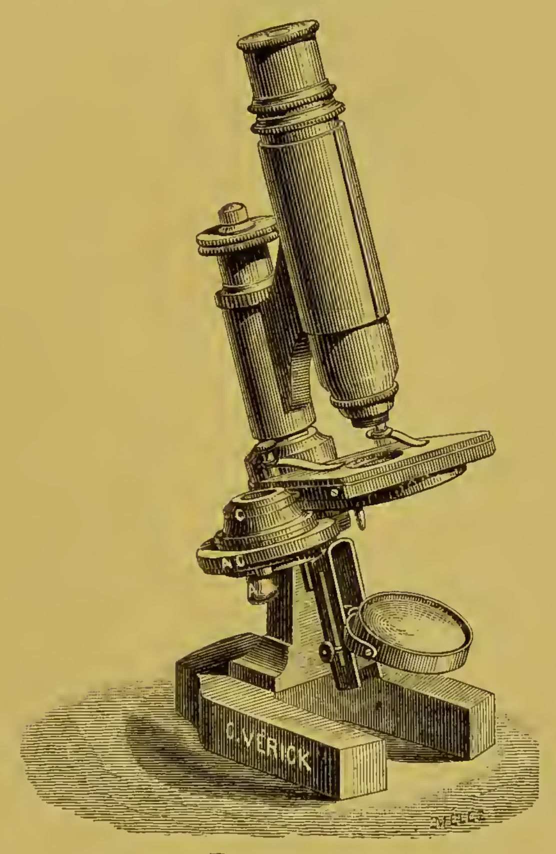


Fig. 70.

tournante; le mouvement lent se fait par le glissement du tube, le mouvement rapide par la vis micrométrique.

L'appareil d'Abbe s'y applique; en tirant le bouton A, on amène toute la pièce A*c* hors de l'axe optique, comme le montre la figure. Le collier *c* porte, soit les diaphragmes à cylindre, soit l'éclairage d'Abbe.

Le modèle n° 5 (fig. 71) ne diffère du précédent que par

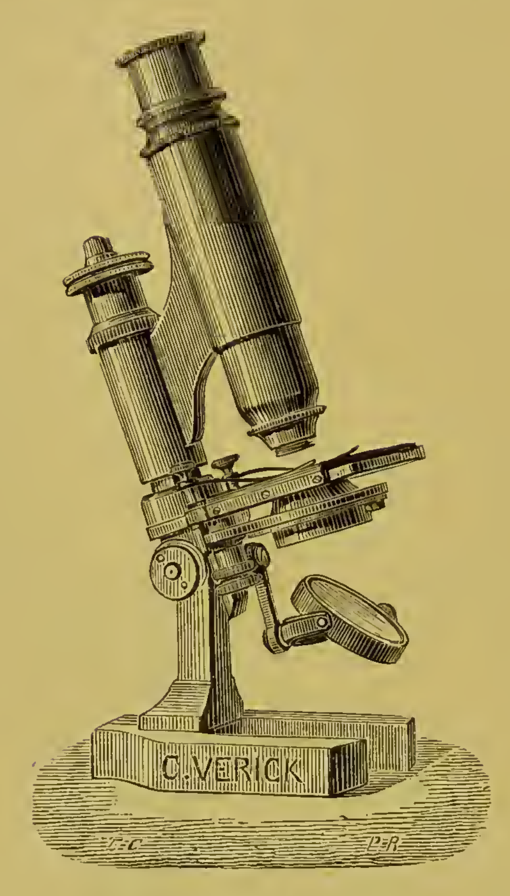


Fig. 71.

les dimensions un peu moindres. La table n'est plus à rotation.

L'appareil d'Abbe s'y applique, comme nous venons de le décrire pour le modèle 4.

Le modèle n° 7 (fig. 72) a le pied en fer à cheval. Il ne s'incline pas; le mouvement rapide se fait par le glissement du tube; le mouvement lent par une vis micrométrique; le tube est à tirage et le miroir donne tous les effets de la lumière oblique; les diaphragmes sont percés dans une

plaque circulaire tournant sous la platine; nous avons déjà dit qu'il était préférable que les diaphragmes soient ajustés par le moyen d'une pièce glissant à tiroir sous la platine. Peut-

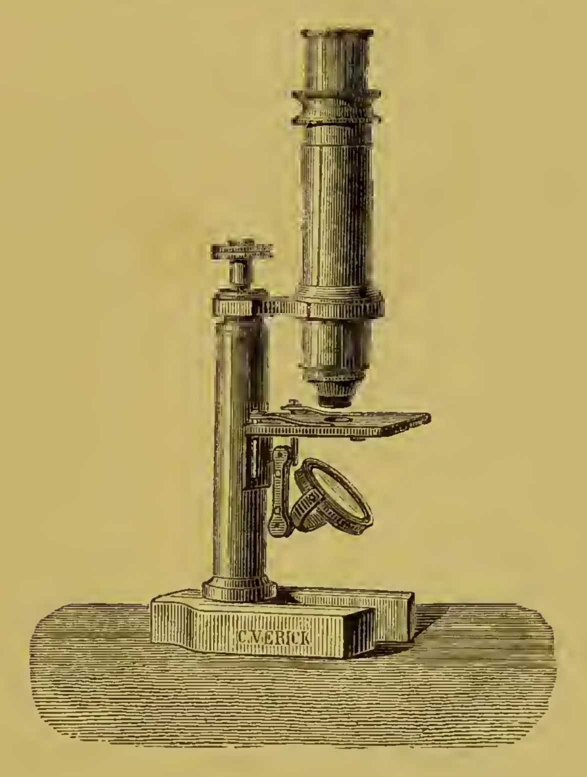


Fig. 72.

être le constructeur consentirait-il à y apporter cette modification; cet instrument serait alors convenable pour les débuts, avec les objectifs 2 et 6 et un oculaire 3. Dans l'état actuel, cette combinaison coûterait 130 francs.

Le modèle n° 6 (fig. 73) diffère du précédent en ce qu'il est suspendu sur deux colonnes; il s'incline ainsi à volonté. Pour les diaphragmes, nous faisons la même réserve que pour le n° 7.

Le microscope de voyage (fig. 74 et 75), construit sur les

conseils du Dr Malassez, est contenu dans un étui ayant les

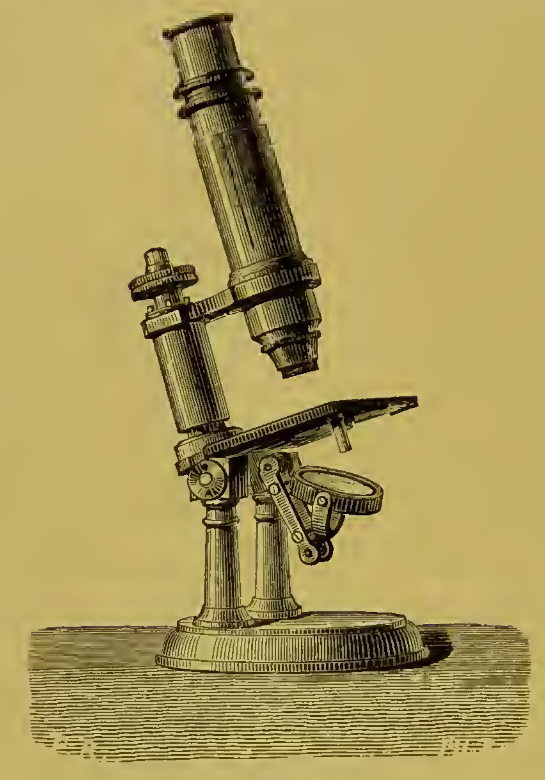


Fig. 73.

dimensions de $0^{m}20 \times 0^{m}10 \times 0^{m}05$; la figure 74 montre

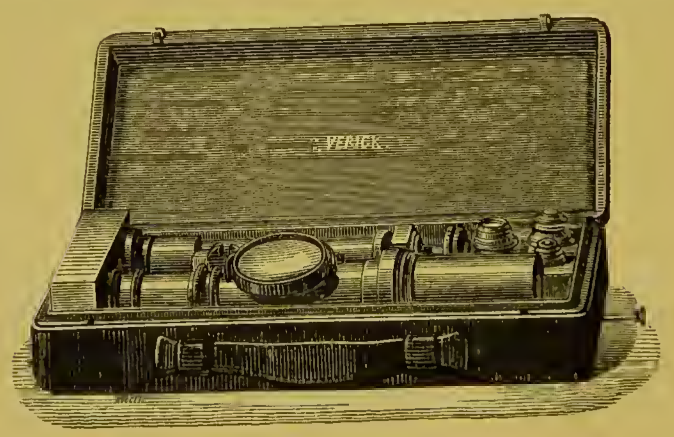


Fig. 74.

l'instrument replié dans la boîte; pour arriver à ce but, on

TABLEAU DES AMPLIFICATIONS OBTENUES PAR LES OBJECTIFS DE VERICK.

OBJECTIFS	Oculaires								FOYER équivalent en pouces anglais
	N° 1		N° 2		N° 3		N° 4		
0*	4	12	»	»	»	»	»	»	»
00	12	16	»	»	»	»	»	»	2 1/2
0	18	25	30	50	40	75	45	85	2
1	30	35	60	100	90	140	100	170	1
2	60	100	80	150	120	220	130	250	1/2
3	80	160	110	210	170	290	200	350	1/4
4	130	210	170	400	300	500	350	600	1/4
6	170	290	220	400	330	500	550	650	1/6
7	210	380	300	550	430	700	540	820	1/9
8	300	570	400	650	540	880	650	1050	1/11
9	320	590	440	740	600	1050	849	1300	1/12
Nouveaux systèmes à immersion et à correction à eau									
8	300	570	400	650	540	880	650	1050	1/11
9	320	590	440	740	600	1050	840	1300	1/12
10	400	650	500	850	690	1250	950	1570	1/16
11	450	740	700	1010	820	1450	1200	1800	1/18
12	500	860	600	1100	900	1600	1300	2000	1/20
13	650	950	850	1350	1200	1700	1700	2500	1/25
15	750	1200	900	1600	1350	1750	1800	3000	1/30
Immersion homogène à huile									
9	320	590	440	740	600	1050	840	1300	1/12
10	400	650	500	850	690	1250	950	1570	1/16
12	500	860	600	1100	900	1600	1300	2000	1/20
13	650	950	850	1350	1200	1700	1700	2500	1/25

NOTA. — L'objectif homogène n° 9 est d'une construction plus simple que les autres objectifs à immersion homogène.

Les faibles grossissements s'obtiennent à l'aide du corps du microscope raccourci, et le chiffre plus élevé avec le corps complètement tiré.

La longueur du tube est dans le premier cas de 145 millimètres, et dans le second de 200 millimètres.

presse la virole A, qui maintient la table B dans la position qu'on lui voit dans la fig. 75. La platine est basculée

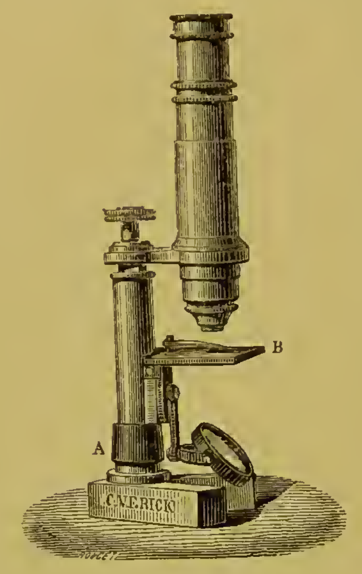


Fig. 75.

sur le côté, le tube est enlevé ; on le glisse dans la douille en le renversant ; le pied est ensuite fermé en ramenant les deux branches l'une contre l'autre, comme dans un compas.

MICROSCOPES ANGLAIS.

Ross, Beck, Crouch, Collins, Negretti et Zambra, etc., construisent des microscopes qui ont une renommée universelle. Les grands modèles de ces opticiens sont construits avec la plus grande perfection. Ce ne sont pas des outils de recherches et de travail courant; leurs prix élevés ne permettent pas au commençant de se procurer ces appareils de luxe. Nous estimons pourtant qu'un grand modèle anglais, avec platine à mouvement pour diriger les préparations avec la combinaison binoculaire et, en général, tous les détails qui

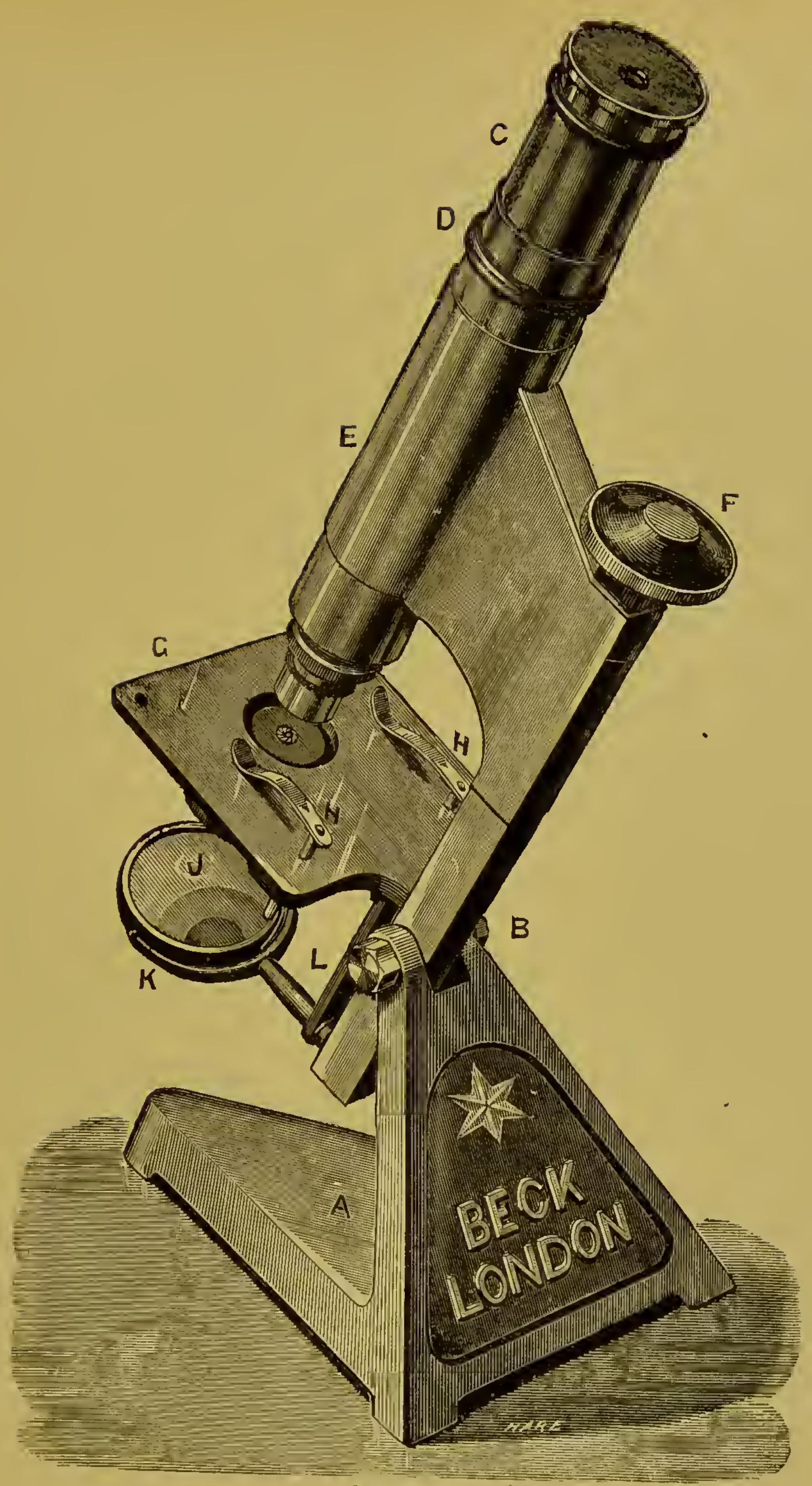


Fig. 76.

distinguent ces microscopes, serait d'une grande utilité dans les laboratoires de recherches.

Beck (68 Cornhill) fournit un stand (statif) (fig. 76), qu'il appelle « star, » avec deux oculaires et deux objectifs, l'un d'un pouce (15° d'ouverture), l'autre de $1/4$ de pouce (ouverture angul. de 90°), qui donnent en combinaison de 60 à 300 diamètres. Le prix est de 3 livres 3 sch., soit 78 fr. 75.

Avec un demi-pouce (35°) et $1/6$ de pouce (110°), le même modèle coûte 4 livres 4 sch. (105 fr.). Grossissement de 90 à 840.

Avec un condenseur (substage condenseur) et une crémaillère pour le mouvement rapide, le prix est 5 livres 15 sch., soit environ 144 francs. Le condenseur coûte seulement 10 sch. On peut le demander avec n'importe quelle combinaison.

La figure 76 représente le corps du microscope; il est à inclinaison; le mouvement rapide se fait par le glissement du tube, le mouvement lent par la vis micrométrique; le miroir est double; la platine est munie d'un diaphragme irisé; par le mouvement d'une vis, l'ouverture peut augmenter ou diminuer. Ces microscopes rendraient des services aux commençants.

Le microscope monoculaire économique de Beck, à inclinaison, à mouvement rapide par crémaillère, mouvement lent par vis micrométrique, miroir plan et concave et diaphragme, est un excellent instrument de travail.

Avec 1 pouce et $1/4$ de pouce (18° et 80°) et deux oculaires (gross. 40 à 415 diamètres), le prix est de 200 francs.

Le prix est 250 francs avec $1/2$ et $1/6$ (38°, 110°) et un con-

denseur achromatique. Le stand seul, avec deux oculaires, est coté au prix de 150 francs.

ACHAT DU MICROSCOPE.

Nous avons passé en revue les instruments de quelques constructeurs renommés; mais il existe encore des opticiens qui mériteraient d'être signalés. Nous sommes obligé de nous arrêter, nous demandant si déjà nous n'avons pas dépassé la limite que comportait cette matière. Mais, pour prémunir le commençant contre de décourageantes déceptions, nous lui conseillons vivement de ne s'adresser qu'à des maisons dont la réputation soit bien établie; on se gardera donc d'acheter à prix réduit de ces misérables instruments exposés aux vitrines de certains marchands de lunettes; avec de pareils outils, qui, par leurs formes et l'étalage de nombreuses lentilles et de dispositions plus ou moins compliquées, peuvent éblouir le débutant, on ne peut faire aucune observation sérieuse; il n'est même pas à conseiller de les donner en étrennes aux enfants, car une simple loupe vaut mieux que cela.

Que l'on achète donc des microscopes à des constructeurs connus, et que ces instruments portent la firme de la maison qui les fournit.

Si l'on ne dispose que d'une somme peu élevée, on se procurera, d'abord, un statif convenable avec un seul oculaire et un seul objectif; par la suite, on complétera la combinaison de lentilles suivant ses ressources.

Cette manière de procéder est d'autant plus facile que maintenant, sur demande, aucun opticien ne refuse d'adapter

au tube le pas de vis anglais. Rien n'empêche ainsi de se procurer le corps de l'instrument avec les oculaires chez un constructeur, tandis que les objectifs sont demandés à une autre maison.

QUELQUES ACCESSOIRES EMPLOYÉS EN MICROGRAPHIE.

Revolvers. — Pour changer rapidement les objectifs pendant le travail sans les dévisser, on emploie des revolvers à



Fig. 77.

2, 3 et même 4 pas de vis, pouvant porter chacun un système.

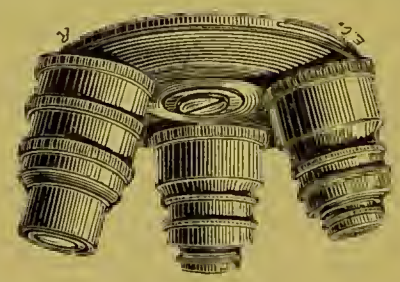


Fig. 78.

Certains revolvers sont construits pour servir uniquement avec la crémaillère appliquée au tube (fig. 77); d'autres sont

adaptés même quand le mouvement rapide se fait par le glissement du tube dans la douille (fig. 78); on s'en servira donc avec n'importe quel microscope.

Adaptateurs. — Nachet a construit, dans ces derniers temps, un adaptateur porte-objectif ingénieux, tout aussi facile que le revolver, et qui permet de changer rapidement

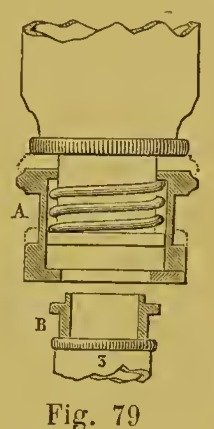


Fig. 79

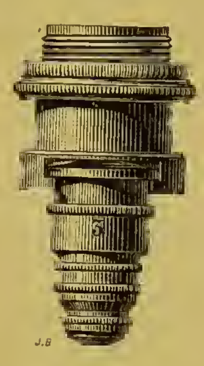


Fig. 80.

les lentilles sans les dévisser et sans perte de temps (fig. 79 et 80).

Le porte-objectif se compose d'un cylindre muni d'un pas de vis anglais qui se fixe sur le tube ; par une fente latérale, on introduit une bague B sur laquelle est vissé l'objectif (3). Un ressort à boudin, dans l'intérieur du cylindre A, fixe intimement l'objectif dans l'axe optique du microscope (fig. 80). Le centrage est parfait.

INSTRUMENT POUR LA MENSURATION DES LAMELLES.

On a vu antérieurement quelle importance avait la connaissance de l'épaisseur des lamelles. Zeiss construit un petit appareil qui permet d'apprécier en $^1/_{100}$ de millimètre

l'épaisseur des verres couvreurs. Cet instrument se compose d'une vis micrométrique à filet régulier et munie à la partie supérieure d'un disque gradué; la lamelle est placée sous la pointe de la vis que l'on amène au contact; on lit ensuite la graduation.

Ce même opticien fabrique un autre appareil, mais beaucoup plus cher; en plaçant la lamelle entre deux pinces, une aiguille en accuse immédiatement l'épaisseur sur un cadran gradué.

MARQUEUR TRAÇANT UN CERCLE SUR LA LAMELLE POUR RETROUVER FACILEMENT UN LIEU DÉTERMINÉ D'UNE PRÉPARATION (FINDER); (fig. 81.)

Dans les recherches microscopiques, il est souvent néces-

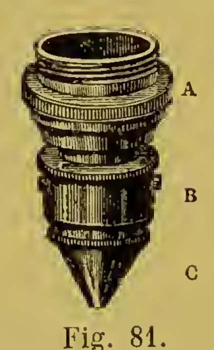


Fig. 81.

saire de retrouver sur une préparation un espace où l'on a rencontré quelque détail important : une diatomée ou un microbe d'une espèce rare se montrent souvent au milieu d'une colonie d'individus différents, une cellule peut revêtir une forme spéciale ou présenter des phénomènes intéressants. Il importe, pour la rapidité du travail, de connaître les moyens qui permettent de ramener facilement sous l'objectif

le lieu qui mérite de fixer spécialement l'attention du micrographe. Un champ déterminé se limitait autrefois en traçant un cercle sur la lamelle tout en appuyant la plume sur l'objectif. Mais la figure ainsi obtenue avait des dimensions considérables. Plusieurs constructeurs ont imaginé divers instruments destinés à marquer ainsi les préparations. Klönne, à Berlin, fabrique un petit appareil à la portée de tous puisqu'il est peu coûteux; c'est ce qui nous engage à le décrire ici. Une pièce fort semblable à l'entonnoir des objectifs de Zeiss est munie à l'extrémité supérieure du pas de vis anglais; l'extrémité inférieure est cylindrique. Dans celle-ci, se meut de bas en haut un cylindre qu'un ressort à boudin interne, à tension faible, oblige à redescendre automatiquement si on le relève. Deux vis latérales fixées dans l'entonnoir empêchent le mouvement de rotation du cylindre mobile. Ce dernier, enfin, porte une pièce conique dans le sommet de laquelle on a foré un espace comme si on voulait produire ainsi un emporte-pièce; en appuyant sur le papier, on obtiendra donc une circonférence.

Quand on voudra retrouver un lieu déterminé sur une préparation, on fixera la lame à la table du microscope; on enduira d'encre ou de bitume l'extrémité de la pièce conique. On enlèvera l'objectif et on adaptera le *marqueur* au microscope. On descendra doucement le tube en se servant du mouvement rapide, puis de la vis micrométrique. La fine extrémité du cône enduite de bitume viendra s'appuyer contre la lamelle et y tracera un cercle d'un 1/2 millimètre de diamètre environ. Le ressort à boudin, cédant sous une légère pression, permettra au cylindre de se relever ainsi; la préparation ne courra aucun risque d'être endommagée par l'écrasement.

A l'aide d'un simple objectif, il sera très facile de retrouver le cercle limité sur la préparation ; s'il s'agit d'observer à un fort grossissement, on fixera l'instrument sur le tube du microscope non armé d'oculaire; on enlèvera l'extrémité conique inférieure; la préparation placée sur la table sera amenée de telle sorte que le cercle imprimé sur la lamelle soit au centre de l'ouverture; un diaphragme, de faible ouverture, donnera plus facilement encore cette dernière position. L'appareil marqueur sera enlevé et l'objectif vissé sur le tube.

Le petit instrument que nous venons de décrire est très pratique; il est appelé à rendre de grands services; il est d'ailleurs d'un prix modeste.

OCULAIRE SPECTROSCOPIQUE (fig. 82 et 83).

La pièce principale dans cet instrument est un système de prismes très réfringents, mais dont le pouvoir diffère; convenablement associés, la déviation que chacun en particulier ferait subir aux rayons lumineux est compensée de manière que la dispersion se produit encore; cet arrangement de prismes est dû à Amici. (Les prismes se voient dans la partie JQR.)

Un oculaire est appliqué à la partie inférieure. Le verre de l'œil est achromatisé. Entre ce dernier et le verre de champ, se trouve un mécanisme contenu dans le tambour A et qui est disposé de telle façon qu'on puisse à volonté agrandir ou diminuer la fente pour l'admission des rayons, et cela par l'intermédiaire de deux plaques B et C; deux viroles H et F meuvent ces plaques par l'intermédiaire de vis. Dans ce

tambour, se trouve aussi le prisme I de comparaison. On peut éteindre ou projeter ce prisme en faisant mouvoir un levier que l'on voit en haut et à gauche de la figure. La lumière est fournie à ce prisme par un miroir que la figure ne montre pas.

Un miroir O envoie la lumière à travers un petit tube

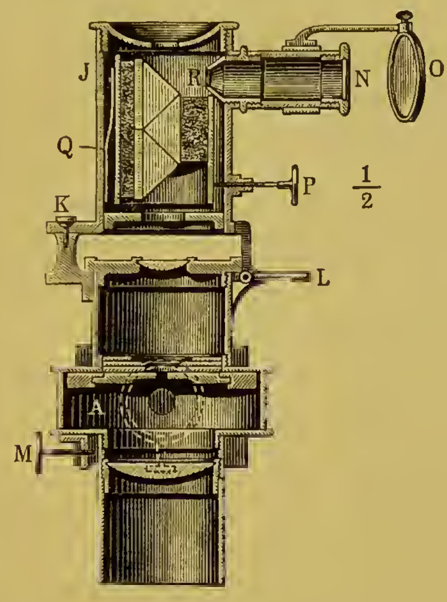


Fig. 82.

contenant une échelle qui est projetée sur le champ du spectre par une lentille achromatique. L'échelle est mobile et on peut la placer, par l'intermédiaire d'une vis, là où on le désire sur le champ du spectre.

Le micro-spectroscope s'applique à l'extrémité du tube au lieu et place de l'oculaire.

Pour les observations, le corps dont on veut faire l'analyse spectrale est placé sur un porte-objet. On écarte la partie supérieure JQNP en la faisant tourner sur l'axe K. On met au point et on examine l'objet par l'intermédiaire de l'oculaire

inférieur; on ramène dans l'axe optique la partie supérieure; on dispose l'échelle et on donne les dimensions nécessaires à la pente par l'intermédiaire des viroles H et F. On fait usage du prisme de comparaison par l'intermédiaire du levier qui permet à la lumière de pénétrer à travers la pente corres-

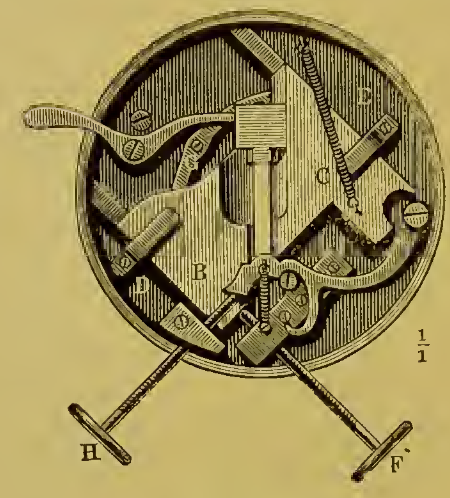


Fig. 83.

pondant à ce prisme. On note alors la *position* et le *nombre* des bandes d'absorption dont le spectre est affecté.

Les meilleurs *tests* pour opérer dans les commencements est le sang, le permanganate de potasse et une solution de chlorure de cobalt dans une solution de chlorure de calcium; un instrument qui montre les lignes caractéristiques de ces corps peut être considéré comme convenable.

On construit des instruments plus simples que celui que nous venons de décrire, dans lesquels le prisme de comparaison est supprimé ainsi que l'échelle; le tambour avec le mécanisme pour la pente existe cependant.

EMBRYOGRAPHE DE HIS.

Cet instrument est une spécialité de la maison Hartnack, qui le construit avec la plus grande perfection; c'est surtout un appareil de laboratoire; mais toute personne s'occupant d'anatomie comparée doit le connaître.

Il arrive très souvent que l'on ait à dessiner, avec toute la régularité désirable et avec différentes échelles, des objets observés sur de faibles grossissements; le professeur His a imaginé un instrument qui permet d'arriver à ce but.

Comme le montre la figure 84, l'embryographe est formé d'une colonne circulaire S supportant une règle T prismatique sur l'une des trois faces de laquelle se trouve une graduation en $^1/_2$ millimètres; inférieurement, on voit un miroir. Sur la colonne se meut une platine qui, par l'intermédiaire d'une crémaillère, fonctionne par une double virole. Au-dessus se trouve une chambre claire d'Oberhaüser; entre cette dernière et la platine, l'objectif est fixé. Ce dernier et la chambre claire peuvent occuper toutes les positions le long de la règle. A côté de l'appareil est placée une boîte dont la face supérieure est munie d'une glace dépolie C; c'est la table sur laquelle on fixe le papier pour dessiner.

L'objet à observer et à dessiner est placé sur la platine dans un verre de montre ou un petit vase. Souvent, les pièces sont opaques, elles sont alors transportées dans un vase à fond noirci.

C'est par la distance entre la chambre claire, l'objectif et la platine que se calcule l'amplification. Les deux dernières

pièces sont fixées à une distance convenable ; la mise au

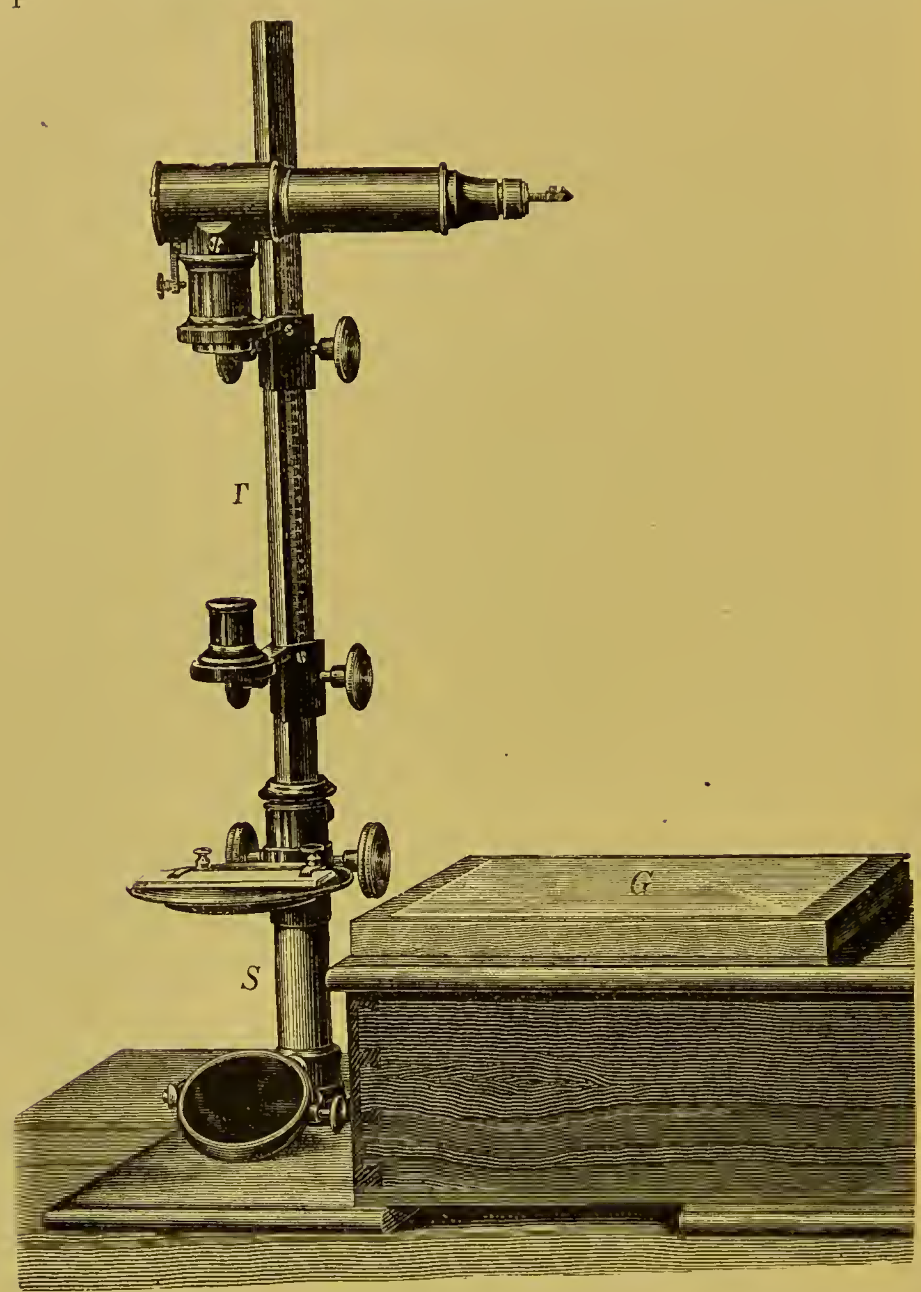


Fig. 84.

point se produit ensuite par le mouvement de la table.

L'embryographe que nous venons de décrire est tout aussi utile en anatomie comparée qu'en embryologie ; on a souvent à dessiner des animaux soit entiers, soit disséqués, et la disposition que nous venons de faire connaître est on ne peut mieux appropriée pour obtenir de bons résultats.

DEUXIÈME PARTIE.

TECHNIQUE PROPREMENT DITE.

Cette seconde partie forme le sujet des conférences publiques que nous avons données en 1883, 84 et 85 à la *Société de Microscopie*. Il avait été convenu officieusement, que chaque conférencier publierait dans les *Annales* les différents points traités pendant ces séances extraordinaires. Pour ce qui nous concerne, l'état de notre santé nous a empêché de réaliser alors ce projet. Voilà pourquoi ce traité de technique paraît aujourd'hui en dehors des publications de la *Société*.

I

RÉACTIFS FIXATEURS ET DURCISSANTS.

Les organismes ou parties d'organisme soumis à l'étude s'examinent, quand la chose est possible, d'abord à l'état vivant, puis ils sont soumis aux réactifs qui les tuent en les fixant dans leur *structure* et dans leur *texture* : on momifie en quelque sorte les tissus dont on veut connaître la nature, essayant de les conserver dans la forme, les dimensions et les rapports qu'ils avaient alors que la vie existait encore.

Les substances qui agissent ainsi altèrent plus ou moins la composition chimique des objets sur lesquels ils opèrent, et cela en modifiant l'albumine qu'ils transforment en la coagulant.

Cette fixation définitive des tissus ou des cellules est très importante; de là dépend tout le succès de l'étude à laquelle on se livre. Mal faite, cette opération peut donner lieu aux plus graves erreurs; par exemple, en faisant prendre pour réelle une forme qui ne serait que le résultat d'une altération due à l'usage d'un réactif employé d'une façon inopportune.

La fixation sera donc faite avec le plus grand soin. On observera les effets des agents mis en œuvre pour l'obtenir; on notera la manière d'employer les réactifs, le temps pendant lequel ils ont agi, les changements produits, etc.

La plupart des réactifs fixateurs durcissent en même temps les tissus; il conviendrait, peut-être, d'étudier sous deux titres différents ces deux espèces d'agents; nous avons trouvé préférable d'étudier une fois pour toutes sans les rappeler deux fois, les substances qui fixent et durcissent les tissus.

L'ALCOOL.

L'alcool est le réactif le plus employé en histologie. Il sert à fixer, à durcir, à déshydrater et à conserver les animaux et les tissus. Pour ces différents usages, on l'amène à diverses concentrations.

L'alcool au $1/3$ de Ranvier se prépare en introduisant dans un flacon un volume d'alcool à 36° de Cartier. On ajoute

deux volumes d'eau distillée; on agite et l'on obtient l'alcool au $^1/_3$ classique (33.3° de l'alcoomètre centésimal).

Ce réactif sera employé dans certains cas pour fixer les éléments dans leurs formes. Remarquons qu'il permet de dissocier facilement les cellules, parce qu'il altère plus ou moins leur substance unissante. Après le traitement par l'alcool $^1/_3$, les réactifs colorants agissent bien et rapidement.

L'alcool au $^1/_{25}$ et au $^1/_{20}$ rend des services avec les objets délicats, tels que la rétine, etc.

L'alcool à 70° vient ensuite; il forme le plus souvent l'intermédiaire entre l'alcool $^1/_3$ et l'alcool à 90°. En passant brusquement de la concentration au $^1/_3$ à celle à 90°, les tissus s'altéreraient infailliblement. Il faut donc passer par la suite des alcools dans les recherches histologiques.

L'alcool à 90° s'emploie comme réactif fixateur; cependant, ses propriétés trop déshydratantes et trop durcissantes font qu'il doit être manié avec prudence. Bouillant, il donne dans certains cas d'excellents résultats; mais alors, c'est surtout la chaleur qui est l'agent de la fixation.

Il achève le durcissement commencé par les autres alcools ou même par d'autres réactifs.

Quand on se propose de déshydrater complètement un objet pour le monter dans le baume ou l'inclure dans la paraffine, on le fait passer successivement dans la suite des alcools en commençant par le plus faible pour arriver enfin à l'alcool absolu.

Le laboratoire sera toujours pourvu des alcools aux concentrations suivantes : 33°, 70°, 90° et 100°.

Les trois premiers seront contenus dans des pissettes

autant que possible bouchées à l'émeri ; le tube, qui donne le jet sous la pression que l'on produit en soufflant, sera étiré en pointe ; on obtiendra facilement ainsi des gouttes ou un jet très fin.

On vérifiera le degré, la force des alcools à l'aréomètre centésimal.

L'alcool absolu sera essayé, afin de s'assurer s'il ne contient pas de l'eau que l'aréomètre n'accuserait pas. A cet effet, on chauffera doucement du sulfate de cuivre dans une petite capsule en porcelaine jusqu'à disparition de la couleur bleue ; dans un tube d'essai contenant un peu d'alcool que l'on veut éprouver, on introduira un fragment de ce sel déshydraté ; si une coloration bleuâtre apparaît, l'alcool n'est pas à 100°, il contient de l'eau.

L'alcool absolu absorbe rapidement l'humidité de l'air ; afin de l'empêcher de se charger ainsi d'eau, on le conservera dans un flacon fermé par un bouchon de liège très dense ; à chaque prise, on recouvrira le goulot d'une capsule en papier parchemin, ou mieux encore d'un capuchon en caoutchouc.

L'alcool absolu se vend 4 francs 50 centimes à Bruxelles, chez Timmermans, droguiste, rue Rouppe. Ce renseignement est donné, parce qu'il arrive sans cesse qu'on demande : *Où vous procurez-vous l'alcool absolu ?*

Comme on le sait, l'alcool est le liquide par excellence où se conservent les animaux et parties d'animaux que l'on veut étudier ou que l'on veut conserver pour les collections ; pour ce dernier usage, c'est l'alcool fort (à 90°) que l'on adoptera, à moins qu'une autre concentration ne soit indiquée pour des cas spéciaux.

Les tissus étant, au préalable, bien fixés par le séjour dans l'alcool, ils se conserveront indéfiniment. Nous avons eu l'occasion d'étudier des objets conservés depuis sept ans; les résultats étaient tout aussi bons que dès le premier jour; il faut veiller, cependant, à ce que l'alcool ne s'appauvrisse pas.

Comme fixateurs, les alcools à 90° et à 100° sont employés bouillants, quand il s'agit de faire pénétrer rapidement les liquides à travers le squelette chitineux de certains arthropodes. Il faut prendre, dans ce cas, des précautions pour que les vapeurs alcooliques ne s'enflamment pas, ce qui produirait des explosions et des accidents fâcheux.

Un objet qui a été fixé par d'autres réactifs, l'acide chromique ou osmique, par exemple, est ensuite durci, en passant par les divers alcools que nous venons d'étudier.

L'alcool à différents degrés entre comme dissolvant dans la préparation de certains réactifs colorants.

Mayer, dans *les Mittheilungen* de la station zoologique de Naples, a fait connaître une formule pour préparer *l'alcool acidulé* (90°), qui agit efficacement sur les animaux marins.

L'alcool pur, en produisant des précipités des sels contenus dans l'eau de mer sur les animaux, ne pénètre pas à travers les tissus; les liquides des cavités viscérales sont coagulés en produisant des agglutinements; la trop longue macération peut également nuire aux tissus.

Par l'alcool acide de Mayer, on évite ces inconvénients.

Voici comme on le prépare : on mélange :

97 volumes d'alcool à 90°,
3 volumes d'acide chlorhydrique.

L'objet étant suffisamment imprégné, on le place dans l'alcool à 70°.

A l'alcool acide préparé comme ci-haut, il est avantageux d'ajouter une petite quantité d'acide picrique. Mais, alors, il faut, par des lavages à l'alcool, enlever toute trace d'acide; ce qui se fait en changeant d'alcool jusqu'à disparition de la coloration jaunâtre. Les lavages se font très bien par l'alcool à 70°.

Dans la préparation de l'aleool, on peut également remplacer l'alcool à 90° par l'alcool à 70° (Whithman). Des éthers eomposés pouvant se former dans l'alcool acide, on ne le préparera qu'au fur et à mesure des besoins.

L'ACIDE OSMIQUE.

On le trouve, dans le eommeree, renfermé dans des tubes scellés dont la contenance est un demi-gramme; il est sous forme de cristaux jaunâtres. Il est dissout dans l'eau distillée suivant diverses concentrations. La solution doit être conservée à l'abri de la lumière, et, autant que possible, dans des flacons jaunes ou noircis extérieurement par un vernis à l'alcool.

On se plaint surtout du peu de stabilité de ce réactif; on trouve qu'il s'altère vite en produisant sur les flacons des dépôts noirâtres; ces mécomptes proviennent souvent du peu de soin que l'on apporte à nettoyer les flacons où on le dissout; les altérations de cet acide, quand il est dilué, proviennent des matières organiques introduites ou laissées dans le flacon.

Voici donc comment on nettoyera le verre qui devra con-

tenir l'acide osmique : on y introduira une dissolution de permanganate de potasse, on agitera; puis, on lavera à l'acide nitrique, contenant un peu d'acide chlorhydrique. On rincera à l'eau distillée, bouillie et bien claire, jusqu'à disparition complète de toute trace d'acide.

Pour dissoudre l'acide osmique, on ouvrira le tube scellé en donnant un trait de lime et on l'introduira ainsi tout entier, contenant et contenu, dans le flacon dans lequel on aura, au préalable, versé la quantité d'eau distillée nécessaire.

On aura toujours sous la main une solution au $^1/_{100}$. Pour l'usage, on fera les dilutions plus faibles à mesure qu'elles seront nécessaires ; les précautions indiquées ci-haut seront prises pour le lavage des flacons où l'on conservera l'acide à $^1/_{500}$ à $^1/_{1000}$, etc.

On évitera de respirer les vapeurs d'acide osmique; elles occasionnent chez certaines personnes des inflammations de la muqueuse des voies respiratoires.

Pour fixer les tissus, il est souvent avantageux, surtout quand il s'agit de membranes ou d'objets minces, de faire agir le réactif qui nous occupe sous forme de vapeurs. La pièce à fixer sera attachée par des épingles sur un fragment de liège; le tout sera suspendu dans un flacon à large goulot fermé à l'émeri et contenant un peu d'acide osmique à $^1/_{100}$. L'espace se saturera rapidement de vapeurs qui seront suffisantes pour donner une bonne fixation; on transportera dans l'alcool à 70° sans laver; on colorera ensuite par le picro-carmin. Nous avons souvent fixé ainsi les *opalines* de la grenouille; ces protozoaires placés dans une goutte d'eau salée sur une lame, on porte cette dernière dans la chambre

humide où on introduit un verre de montre contenant quelques gouttes d'acide osmique à $^1/_{100}$; après 20 minutes, quelquefois 30 minutes, on obtient des infusoires parfaitement fixés et se colorant très bien par le picro-carmin.

Autrefois, on employait l'acide osmique à l'état très concentré ; certains auteurs l'ont déjà recommandé à $^1/_{10}$; mais il ne fallait alors le laisser agir que quelques instants. Il vaut mieux l'employer en dissolution faible et le laisser agir un temps plus long.

Les tissus contenant beaucoup de graisse se teignent en noir foncé par l'acide osmique ; il vaut mieux, avec de tels tissus, faire usage d'autres réactifs.

Après l'emploi du réactif qui nous occupe, on lave à l'eau avec soin, afin d'enlever toute trace d'acide qui pourrait, par la suite, produire des colorations noirâtres ; on transporte enfin dans l'alcool à 70°.

Les tissus préparés par l'acide osmique présentent assez bien de résistance à se colorer par les liquides carminés ; le picro-carmin donne cependant, dans la plupart des cas, de bonnes colorations.

En résumé, en employant l'acide osmique, on fera attention aux points suivants :

1° Faire agir l'acide osmique à l'état de vapeurs quand c'est possible ;

2° Préférer l'emploi de dissolutions faibles en laissant plus de temps à la réaction pour se produire ; concentré, l'acide osmique ne doit agir que quelques moments ;

3° Les tissus sont soumis à l'acide osmique à l'abri de la lumière ;

4° Laver à l'eau distillée après fixation ;

5° Ne pas employer ce réactif avec les tissus graisseux;
6° Passer dans l'alcool à 70° après le lavage.

ACIDE PICRIQUE ET LES RÉACTIFS QUI EN DÉRIVENT.

On trouve dans le commerce l'acide picrique sous forme de lamelles jaunes, brillantes, soyeuses, douces au toucher.

Nous croyons utile de faire connaître sa solubilité dans l'eau à différentes températures :

A 5°,	100	parties	d'eau	dissolvent	0,6	parties	d'acide	picrique.
A 15°,	»	»	»	»	1,16	»	»	»
A 20°,	»	»	»	»	1,24	»	»	»
A 22°,	»	»	»	»	1,30	»	»	»
A 26°,	»	»	»	»	1,37	»	»	»
A 77°,	»	»	»	»	4,00	»	»	»

On aura toujours sous la main au moins un litre d'une solution saturée; pour cela, le flacon dans lequel on le conservera contiendra des cristaux en excès.

S'il faut préparer rapidement une solution saturée, on se servirait d'eau bouillante; dans un litre, on ferait dissoudre 15 grammes d'acide picrique cristallisé; cette quantité entière entrera d'abord en dissolution sous l'influence de la chaleur; mais, par le refroidissement, des cristaux ne tarderont pas à réapparaître.

C'est à l'état concentré que la solution picrique est employée pour fixer les tissus; elle doit agir un temps d'autant plus long que les pièces sont plus volumineuses. On ne laisse pourtant pas ces dernières séjourner dans ce liquide pendant plus de vingt-quatre heures.

Après fixation, on lave à l'alcool; l'eau produirait des effets

désastreux; aussi ne faut-il jamais employer cette dernière au lavage dans cette circonstance. Le picro-carmin peut servir subséquemment pour la coloration; mais c'est là le seul liquide en solution aqueuse qui puisse donner de bons résultats; les liquides carminés alcooliques coloreront très bien les pièces fixées comme nous venons de le voir.

LIQUIDE DE KLEINENBERG.

(Acide picro-sulfurique.)

On le prépare en ajoutant à :

100 volumes de la solution concentrée d'acide picrique,

3 volumes d'acide sulfurique concentré.

Il se forme un précipité.

On filtre.

A un volume du liquide recueilli, on ajoute 3 volumes d'eau.

Quant au précipité retenu sur le filtre, il n'a aucun usage; il est donc rejeté.

Pour fixer les idées, supposons que l'on prenne 100 centimètres cubes de la solution saturée d'acide picrique : on ajoute 3 centimètres cubes d'acide sulfurique ordinaire, mais concentré. Après filtration, si l'on recueille 90 centimètres cubes, il suffira d'ajouter au filtrat 3 fois 90 c/c.

Kleinenberg avait remarqué que cette solution gonflait le tissu conjonctif; pour obvier à cet inconvénient, il avait ajouté un peu de créosote à sa solution. Il a été reconnu depuis que cette addition est sans effet.

Les objets ne doivent séjourner pas plus de six heures dans l'acide picro-sulfurique; ils sont ensuite placés dans

l'alcool à 70 %, puis dans l'alcool à 90° pour y être durcis; par le lavage à l'alcool, il faut faire disparaître ce réactif des tissus; ceci est important.

Le liquide de Kleinenberg donne de bons résultats avec beaucoup d'invertébrés; avec les vertébrés, les préparations sont moins satisfaisantes parce qu'il gonfle le tissu conjonctif. Les embryons des vertébrés sont parfaitement fixés dans ce liquide; aussi, en embryologie, est-il très estimé. L'acide enlevé complètement, c'est avec la plus grande facilité que les réactifs colorants opèrent.

Des liquides carminés aqueux, il ne faut se servir que du picro-carmin; peut-être aussi le carmin aluné colorerait-il convenablement sans altération. Les solutions alcooliques de carmin doivent être préférées aux solutions aqueuses.

Mayer, de Naples, à qui on doit tant d'excellentes formules applicables à l'histologie, préfère l'acide picro-sulfurique préparé comme suit :

A 100 volumes d'eau,
il ajoute 2 volumes d'acide sulfurique.

Il introduit ensuite de l'acide picrique cristallisé dans cette solution jusqu'à ce qu'elle n'en dissolve plus; il filtre et il ajoute au liquide qui passe 3 volumes d'eau.

L'auteur de cette formule a constaté qu'à travers la chitine des insectes, le liquide qui précède pénétrait plus facilement.

Qu'il soit préparé par n'importe quelle méthode, l'usage de ce réactif donne lieu aux observations suivantes :

1° *Ne jamais laisser une pièce plus de 6 heures dans ce liquide;*

2° *Sur les vertébrés, quand le tissu conjonctif est abondant, il y a tendance à gonflement et à altération;*

3° *Quand il se produit un trouble dans le liquide, alors qu'il agit sur une pièce, il faut le renouveler immédiatement;*

4° *Éviter l'usage de l'acide picro-sulfurique avec des tissus contenant du carbonate de chaux; il se dégagerait de l'acide carbonique qui pourrait produire des déchirements, et des cristaux de gypse se déposeraient dans les tissus;*

5° *Passer de l'acide qui nous occupe à l'alcool à 70°;*

6° *Laver à l'alcool à 90° jusqu'à disparition de la coloration jaunâtre; l'alcool chaud accomplira cet enlèvement d'une façon plus rapide;*

7° *Comme liquide colorant aqueux, ne choisir que le picro-carmin; faire usage pour colorer de solutions alcooliques.*

ACIDE PICRO-NITRIQUE ET PICRO-CHLORHYDRIQUE DE MAYER.

L'acide picro-sulfurique, nous venons de le voir, peut, avec le carbonate de chaux, produire par double décomposition, du sulfate de chaux; des cristaux de gypse se forment dans les tissus; en outre, le dégagement rapide de CO^2 peut altérer les mécaniquements.

Mayer, pour éviter ces inconvénients, prépare l'acide picro-nitrique comme suit :

A 100 volumes d'eau,

il ajoute 5 volumes d'acide nitrique (contenant 25 °/₀ d'anhydride azotique AZ^2O^5). A cette solution, on ajoute de l'acide picrique tant qu'elle en peut dissoudre. On filtre; le liquide obtenu n'est pas dilué.

Quant à l'acide picro-chlorhydrique, on l'obtient en faisant une solution de :

100 volumes d'eau,
8 volumes d'acide chlorhydrique (contenant 25 % de sel gazeux).

On ajoute à ce liquide la quantité d'acide picrique nécessaire pour le saturer complètement ; filtrer et employer sans diluer.

ACIDE CHROMIQUE ET SES DÉRIVÉS.

L'acide chromique se rencontre dans le commerce sous forme de beaux cristaux rouges ; il faut qu'il ne contienne pas d'acide sulfurique.

Il est très avide d'eau ; il faut donc le conserver dans des flacons bouchés à l'émeri ; il altère rapidement, d'ailleurs, le liège.

En histologie, on l'emploie dilué dans l'eau, à diverses concentrations. Il était, autrefois, admis en solutions fortement concentrées ; cette pratique est abandonnée aujourd'hui.

Il se combine chimiquement aux tissus ; il les tanne en quelque sorte ; il n'est donc pas possible de l'enlever complètement, comme l'acide picrique, par des lavages. C'est ce qui fait qu'il est si difficile de colorer avec les réactifs carminés après avoir fixé à l'acide chromique. Cependant, après un séjour assez long dans l'alcool fort, alors que les tissus ont pris une coloration verdâtre, les liquides carminés (surtout le picro-carmin) agissent d'une façon satisfaisante.

Les couleurs d'aniline teignent bien les pièces fixées par l'acide chromique ; mais les résultats obtenus par la safranine et l'hématoxyline surpassent de beaucoup ce que peuvent donner toutes les solutions colorantes possible.

Nous avons souvent employé l'acide chromique pour préparer des larves de batraciens entières; toujours, nous avons obtenu de bonnes préparations par l'acide chromique à 3 pour 1000, agissant pendant 24 heures; puis en faisant séjourner les pièces dans la suite des alcools, depuis l'alcool $^1/_3$.

Le bichromate de potasse seul est rarement employé à la fixation des tissus. Pour le durcissement, on admet qu'il faut une dose 10 fois plus forte que s'il s'agit de l'acide chromique. C'est ordinairement à la concentration de 2 à 5 % qu'on en fait usage.

Le liquide Müller vaut mieux que le bichromate seul; on le prépare en faisant dissoudre dans :

100 parties en poids d'eau,
2 » » » de bichromate de K,
1 » » » de sulfate de soude.

On lave d'abord à l'eau, puis on fait parcourir à la pièce la suite des alcools.

Le séjour dans le liquide de Müller doit être prolongé.

Le liquide d'Erlicki est obtenu en remplaçant dans la formule précédente la quantité de sulfate de soude par $^1/_2$ % de sulfate de cuivre; voici donc la formule :

100 parties en poids d'eau,
2 » » » de bichromate de potasse,
$^1/_2$ » » » de sulfate de cuivre.

Ce liquide donne de meilleurs résultats que le liquide de Müller, tant pour fixer que pour durcir.

Après le séjour dans le liquide d'Erlicki, on lave à l'eau; on fait usage ensuite des différents alcools.

Avec les larves de batraciens, nous avons obtenu de très

belles préparations où, dans les coupes par la paraffine, nous avons trouvé les figures karyokinétiques, non seulement dans les tissus, mais encore dans les globules du sang ; voici comment : par litre de liquide de Müller, nous ajoutons 3 grammes d'acide chromique. Lavage à l'eau ; — suite des alcools ; — picro-carmin, etc.

BICHLORURE DE MERCURE.

Il n'y a pas bien longtemps que ce réactif a été introduit, comme fixateur du moins, dans les laboratoires d'histologie et d'anatomie comparée. Cette substance a la précieuse qualité de tuer rapidement les organismes, tout en les fixant et les durcissant ; tous les réactifs colorants agissent très bien par la suite.

Le bichlorure de mercure rendra de grands services aux débutants et à l'amateur isolé ; son prix peu élevé fera qu'on le substituera dans bien des cas à l'acide osmique. A froid, c'est en solution concentrée qu'on l'emploie. On peut le faire agir 24 heures quand les objets sont assez volumineux ; en quelques minutes, il fixe les infusoires. Quant aux embryons des vertébrés, il les fixe très bien.

Lang, de Naples, avec une solution bouillante, fixe les planaires ; il traite ensuite par l'alcool à 70°, à 90° et à 100°.

On doit à Lang plusieurs formules excellentes où entre le sublimé comme base du réactif.

Première formule, surtout pour les planaires :

Eau,	100 parties.
Chlorure de sodium,	5 à 10 parties.
Acide acétique,	5 à 8 parties.

Bichlorure de mercure, 3 à 12 parties (Zool. Anzeiger, 1878).

On laisse réagir pendant 30 à 60 minutes; puis, on transporte dans les alcools depuis 70° jusque 100°.

2e *formule de Lang* (Zool. Anzeiger, 1879).

A 100 volumes d'acide picro-sulfurique, on ajoute 5 volumes d'acide acétique; on y dissout, ensuite, du sublimé, de façon à obtenir une solution concentrée. Ces solutions peuvent être employées non seulement avec les planaires, mais encore avec bien des invertébrés, et surtout les vers, les cestodes, les trématodes, etc.

Avec les némertiens, le chlorure mercurique bouillant nous a donné de bons résultats.

Les objets qui ont été préparés par une solution contenant du chlorure mercurique ne peuvent plus être touchés avec des instruments en fer ou en laiton, sinon il se produirait des précipités grisâtres; on transporte les pièces à l'aide de spatules ou de petites pinces en bois ou en caoutchouc. Cependant, une fois inclus dans la paraffine, le rasoir n'a plus d'action sur les objets ainsi préparés.

Carnoy, le savant professeur de biologie à Louvain, a modifié la formule de Lang comme suit :

Eau,	100 p.
Acide acétique,	5 p.
Ou chlorure de sodium,	3 p.
Bichlorure de mercure,	5 p.

Le chlorure mercurique bouillant sera employé avec succès quand il s'agit de fixer des animaux qui jouissent du pouvoir de se rétracter quand on les inquiète; il en est ainsi avec bien des vers, les planaires, les némertiens, le lombric,

le gordius, etc. Pour s'en servir à chaud, on fait bouillir, dans un ballon ou dans une capsule, une dissolution saturée à froid de chlorure mercurique. On verse ce liquide sur les animaux contenus dans un vase convenable; — on laisse réagir quelques moments, de façon que les organismes deviennent blanchâtres; on transporte ensuite, à l'aide d'une spatule en bois, dans de l'alcool à 70 p. c., dans lequel, par 20 *cc*, on aura ajouté 4 à 5 gouttes d'acide chlorhydrique; on change, ensuite, l'alcool, et on le remplace successivement par l'alcool à 70°, à 90° et à 100°. On laisse séjourner un temps plus ou moins long dans chacun de ces liquides, suivant les dimensions des animaux.

LIQUIDE DE MERKEL. (Journal R. M. S., 1882.)

1° On dissout une partie en poids de chlorure de platine dans 400 parties d'eau;

2° On dissout une partie en poids d'acide chromique dans 400 parties d'eau.

On mélange volumes égaux de ces deux solutions.

L'auteur de cette formule l'a appliquée pour fixer la rétine. Le Dr Eisig l'a employée pour l'étude des capitellides.

Les objets restaient dans le liquide pendant 3 à 5 heures, puis, ils étaient transportés dans l'alcool à 70 p. c. Avec de petites sangsues, Whithman a trouvé qu'une heure suffisait, mais il employait alors l'alcool à 50 p. c. Avec des larves de batraciens, et surtout de salamandres, le réactif de Merkel nous a donné de bonnes préparations. Les colorations carminées se font mieux que si l'on employait l'acide chromique seul.

ACIDE NITRIQUE.

L'acide nitrique a été employé, dans ces derniers temps surtout, à l'étude de la karyokinèse et de l'embryologie.

Entre les mains d'histologistes expérimentés, ce réactif est, sans nul doute, excellent; mais les débutants feront bien d'en user avec circonspection.

Flemming se sert de l'acide nitrique (Journal R. M. S., 1882, et Arch. f. Mikr. Anat., 1881), à la concentration de 40 à 50 p. c.; il lave ensuite à l'eau distillée jusqu'à disparition de la couleur jaunâtre; il colore au carmin acétique.

Pour l'étude des embryons de vertébrés, on en use en solution aqueuse contenant 3 à 3 $^1/_2$ p. c. d'acide.

Pour les blastodermes, 15 à 25 minutes suffisent; laver ensuite à l'alcool au $^1/_3$. Avec des embryons de poulets, nous avons obtenu des préparations très satisfaisantes.

ACIDE ACÉTIQUE.

L'acide acétique est employé à diverses concentrations, quelquefois même pur; mais alors, il faut ne le laisser agir que peu de temps.

En solution aqueuse contenant 1 p. c. d'acide, on l'emploie depuis longtemps pour fixer et faire apparaître les noyaux. En réagissant sur l'albumine, il rend certaine cellule plus transparente; sur les œufs de certains trématodes, il fait très bien ressortir les noyaux invisibles, englobés qu'ils sont par une masse albuminoïde granuleuse.

Cet acide intervient dans la préparation de quelques liquides carminés. Flemming l'a employé à $^1/_{100}$ pour l'étude de la karyokinèse sur des œufs de planaires marines.

Nous avons obtenu de superbes figures karyokinétiques par l'acide acétique à $^2/_{100}$ sur des œufs de planaires marines. La coloration était réalisée par le carmin acétique en solution aqueuse..

L'ACIDE FORMIQUE.

L'acide formique jouit des mêmes propriétés que l'acide acétique. On l'ajoute à la glycérine pour monter les préparations comme nous le verrons plus loin.

CHLORURE D'OR.

Le chlorure d'or doit être employé avec beaucoup de circonspection par les commençants; les auteurs expérimentés ne sont pas même sûrs des résultats qu'ils obtiendront par son usage; c'est, cependant, un réactif précieux pour mettre en relief les terminaisons nerveuses. Pour l'étude du cartilage, la solution à $^1/_{200}$ convient comme Ranvier l'indique; on laisse réagir de sept à quinze minutes sur des blocs de 4 à 5 mm.

NITRATE D'ARGENT.

On emploie le nitrate d'argent à diverses concentrations surtout pour l'étude des épithéliums et des endothéliums; il colore en noir intense la substance unissante des cellules qui forment ces deux espèces de tissus. Des auteurs, pour

y arriver, prennent des solutions très fortes; il est préférable que ce réactif soit très dilué, de $^1/_{200}$ à $^1/_{1000}$. Comme fixateur d'autres tissus, il pourrait servir; seulement, les résultats sont incertains.

IODE.

En solution alcoolique ou mieux en solution dans l'iodure de potassium aqueux, l'iode est le réactif par excellence du *glycogène*.

Il teint en jaune les cellules cartilagineuses et il laisse presque incolore la substance fondamentale de ce tissu; il sert également à fixer les infusoires.

Ranvier donne la formule suivante pour le préparer :

Eau distillée, 100.
Iodure de potassium, 2.
Iode, quantité suffisante pour saturer.

SOLUTIONS DIVERSES AYANT POUR BASES QUELQUES-UNS DES RÉACTIFS QUI VIENNENT D'ÊTRE ÉTUDIÉS.

Formules de Flemming. Pour l'étude des figures karyokinétiques, cet auteur, dans son ouvrage *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung,* conseille les solutions suivantes :

A. Acide chromique, 0,2 — 25 p. c. dans H^2O.
Acide acétique, 0,1 dans H^2O.

On laisse seulement une demi-heure dans ce liquide; on teint par l'hématoxyline.

B. Acide chromique à 1 p. c., 15 parties.
Acide osmique 2 p. c., 4 parties.
Acide acétique glacial 1 partie (ou moins).

Les pièces restent dans ce réactif ainsi préparé pendant deux ou trois jours jusqu'à durcissement complet; elles sont lavées à l'eau, puis durcies complètement dans l'alcool. La teinte est obtenue avec une solution concentrée de safranine; on lave ensuite à l'alcool contenant 0,5 p. c. de HCl.

Le Dr C. Rabl *(Morphol. Jahrb.* 1884) trouve que la solution B de Flemming durcit trop vite; il obtient de meilleurs résultats par une solution des acides chromique et formique dont voici la formule :

200 gr. d'une solution à $1/2$ p. c. d'acide chromique;
Quelques gouttes d'acide formique concentré.

On doit préparer en petite quantité cette solution et en faire usage immédiatement. Les pièces à traiter doivent être petites. Après 12 à 24 heures, on lave à l'eau et on transporte dans l'alcool à 70 p. c.; après 24 heures, on fait usage de l'alcool absolu.

Nous avons obtenu de très bons résultats en préparant des larves de batraciens et des némertiens par le liquide suivant :

Liquide de Kleinenberg,	100 vol.
Acide osmique $1/1000$,	100 vol.

On traite ensuite par les alcools à 70, 90 et 100; on colore par le picro-carmin.

Nous venons de passer en revue les réactifs les plus employés en histologie et en anatomie. Il y a de quoi effrayer un novice, il faut en convenir. Mais que le commençant se rassure; dans le principe, toutes ces solutions ne sont pas nécessaires; voici celles qui seront indispensables dès le début :

1° L'acide osmique à $1/100$, que l'on amènera en cas de besoin à $1/1000$.

2° Le liquide Kleinenberg et la solution saturée d'acide osmique.

3° L'acide chromique à $^{1}/_{100}$ en vue de le diluer comme il sera demandé.

4° Le chlorure mercurique saturé.

5° Le liquide de Müller et le liquide d'Erliki.

Quand on saura tirer parti des solutions qui précèdent, il sera temps encore de préparer les autres réactifs.

II

RÉACTIFS COLORANTS (1).

Les réactifs colorants sont actuellement si nombreux qu'on a dit, un peu ironiquement, que les laboratoires d'histologie n'étaient plus que de vastes teintureries. Sans doute, bien des formules ne s'emploient que rarement; d'autres, imaginées quand la chimie des tissus était moins connue, sont maintenant abandonnées; mais il se présente des difficultés dans les recherches où ces réactifs, si nombreux qu'ils soient, ne donnent aucun résultat satisfaisant. Il faut inventer encore pour arriver au but; toute nouvelle découverte dans cette voie est un pas de plus dont nos successeurs auraient tort de se plaindre; aussi doit-on accueillir avec reconnaissance toute innovation que la pratique confirmera.

Pour le débutant, il aura à s'exercer sur des sujets connus; il sera guidé sûrement. Pour éviter toute confusion, les liquides qui lui seront conseillés seront peu nombreux

(1) On peut se procurer tous les réactifs pour les études micrographiques chez M. Drosten, rue des Boîteux, 21, Bruxelles.

dans le prineipe. Nous signalerons les solutions qui doivent prendre plaee dans l'offieine du commençant; à mesure qu'il fera des progrès dans la technique, il aura reeours à tels liquides qui lui paraîtront convenir, en tenant eompte des moyens reeommandés pour en tirer le meilleur parti.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS COLORANTS DÉRIVÉS DU CARMIN OU DE LA COCHENILLE.

C'est Hartig qui, le premier, en 1854, appliqua le earmin aux recherehes histologiques. Ses premières expérienees eurent lieu sur des tissus végétaux. Mais c'est à Gerlach que revient l'honneur d'avoir employé la même substance à eolorer des tissus animaux (*Mikroskopische Studien aus dem Gebiete der menschlichen Morphologie,* Erlangen, 1858). Quatre ans déjà avant la publieation du travail qui vient d'être cité, le même auteur avait eonstaté qu'après une injee-tion au carmin ammoniaeal, les tissus s'étaient colorés et que les noyaux avaient pris une teinte plus vive que les eel-lules et la substanee intracellulaire.

Les solutions carminées seront maniées exelusivement dans les débuts, parce qu'elles donnent des résultats cer-tains, même entre des mains peu expérimentées. L'élève devra donc acquérir, non seulement l'habileté nécessaire pour en tirer parti, mais encore il apprendra à les préparer.

Tout histologiste, d'ailleurs, doit composer lui-même ses réactifs colorants. Dans le commeree, il est possible de trouver les solutions apprêtées soigneusement; mais on ne sait jamais comment elles ont été obtenues et quelle en est la valeur qualitative. Il faut, enfin, que toute personne

qui s'occupe de l'étude de la cellule puisse modifier la formule des réactifs suivant la nature chimique des êtres soumis à l'observation.

Sur tel tissu, sur tel organisme fixé par un liquide connu et déterminé, le picro-carmin, par exemple, donnera toujours le même résultat; mais quand le chercheur sera en présence d'un sujet non encore étudié et sur lequel bien des *fixateurs* connus seront essayés en vain, il faudra chercher alors le réactif fixant convenable. L'expérimentateur devra également découvrir la manière de colorer dans cette circonstance; souvent, il n'arrivera au but que par une formule nouvelle.

Si, dans bien des cas, les méthodes connues peuvent être mises en usage *ne varietur*, il faut s'attendre que bien souvent, dans les études originales, on aura à trouver soi-même la voie à suivre pour réussir sur un sujet neuf. On arrivera par tâtonnements à établir l'ensemble des réactions fixatrices, colorantes et autres par lesquelles un organisme passera pour que sa texture nous soit révélée. On prendra pour guide les moyens suivis par un auteur qui a étudié un être semblable à celui que l'on veut décrire. On fera des essais et l'on modifiera les procédés actuellement connus, suivant les indications fournies par l'expérience. Il ne faut pas se le dissimuler, la période pendant laquelle on cherche les agents fixateurs et colorants qui doivent être mis en œuvre pour réussir est presque toujours ardue et quelquefois pénible. C'est ici qu'il faut de la persévérance; c'est ici que l'esprit d'initiative aura à s'aiguiser pour vaincre les difficultés matérielles des méthodes, afin d'arriver à la connaissance exacte des organismes dans leur développement et dans leur structure.

Que l'étudiant, tout en suivant scrupuleusement les principes indiqués par les auteurs dans leurs méthodes, considère ces dernières comme devant varier constamment suivant les besoins. Tel histologiste a réussi avec une solution colorante à 1 p. c. de carmin; dans une autre circonstance, il devra employer une liqueur contenant dix fois moins de cette substance colorante.

Nous croyons avoir suffisamment justifié ce conseil : n'employez que des réactifs colorants que vous aurez préparés vous-même; habituez-vous à réussir les solutions pour que vous puissiez vous passer d'autrui, et surtout ayez le moins possible recours au commerce. Nous irons plus loin : si vous travaillez dans un laboratoire, ne confiez pas même au *garçon* la préparation de vos réactifs.

Le carmin varie beaucoup ; on ne fera usage que de la première qualité (n° 40), présentant une belle couleur rouge vive. Quand il est pur, il est entièrement soluble dans l'ammoniaque. Cette substance n'a pas une composition chimique déterminée. La préparation en est tenue secrète ; cependant, Mme Genette a publié la recette suivante :

Deux livres de cochenille sont pulvérisées et ajoutées à 150 livres d'eau ; on fait bouillir pendant 2 heures ; puis on ajoute 90 grammes de salpêtre pur ; on fait bouillir 3 minutes, puis on ajoute 120 grammes de sel d'oseille. Le liquide, éclairci par un repos d'un quart d'heure, est abandonné pendant 3 semaines dans un vase plat ; le carmin se dépose, on le sépare, le lave et le sèche à l'ombre.

Le carmin commercial est souvent falsifié avec l'amidon, le kaolin, le vermillon ; l'ammoniaque qui le dissout complètement permet de le séparer de ces impuretés.

ACIDE CARMINIQUE.

Solution alcoolique d'acide carminique de G. Dimmock. (Amér. Natural, 1884. — Journal Roy. Micr. Soc., 1884.)

Dimmock a proposé pour colorer les coupes une solution contenant :

Acide carminique, 0,^{gr}25.
Alcool à 80 p. c., 100 grammes.

Les sections se colorent en 2 à 5 minutes.

L'acide carminique est soluble dans l'eau et dans l'alcool. Il se conserve sans décomposition.

En solution alcoolique, on peut y ajouter un peu d'acide picrique; on obtient ainsi un liquide analogue au picro-carmin et qui donne une double teinte. En ajoutant à la même solution alcoolique quelques gouttes d'ammoniaque, on prépare, quand on le désire, du carminate ammonique; le liquide devient alors rouge foncé.

Voici comment l'acide carminique est retiré de la cochenille :

On épuise la cochenille par l'eau bouillante ; on précipite par l'acétate neutre de plomb, rendu un peu acide par l'acide acétique. Toute la matière colorante est entraînée par le précipité bleu violet qui se forme; le liquide filtré est à peu près incolore. On lave à l'eau chaude le précipité, qui est composé de carminate de plomb, de phosphate du même métal. On décompose par l'acide sulfurique ou par l'hydrogène sulfuré; dans ce dernier cas, on a soin de laisser indécomposé un peu de carminate de plomb.

L'acide carminique devenu libre se dissout; le phosphate

de plomb reste insoluble; on décante, on filtre le liquide, et on évapore à sec et au bain-marie; le résidu est repris par l'alcool absolu; par l'évaporation de l'alcool absolu, on obtient l'acide carminique cristallisé; il n'est même pas nécessaire de reprendre par l'alcool.

L'acide carminique sera conservé à sec; on le diluera dans l'alcool à mesure qu'il sera nécessaire. Cette préparation paraît longue et difficile; cependant, on peut préparer facilement cette substance en moins de 3 heures.

CARMINATE D'AMMONIAQUE DE RANVIER.

(*Traité de Technique*, p. 97.)

Un gramme de carmin bien pulvérisé est broyé dans un mortier en porcelaine avec un peu d'eau; on ajoute un gramme d'ammoniaque; le carmin est dissout; on étend d'eau distillée, de manière à obtenir en tout un volume de 100 centimètres cubes.

Comme l'auteur de cette préparation l'indique, il est nécessaire qu'il y ait le moins possible d'ammoniaque en excès; la coloration se fait d'autant mieux que la solution est moins alcaline. Par l'évaporation, on amènera la solution à l'état neutre; pour cela, on chauffera au bain-marie jusqu'à commencement de précipité rougeâtre.

CARMIN DE FREY.

Carmin,	0,gr30.
Eau distillée,	30 grammes.

Ammoniaque, quantité suffisante jusqu'à dissolution.

Glycérine, 30 grammes.

Alcool, 4 grammes.

D'après Ranvier, cette solution n'a pas grand avantage au point de vue de la coloration; mais elle se conserve sans altération pendant longtemps.

CARMIN DE BEALE.

Carmin,	$0^{gr}64$.
Ammoniaque,	3^{gr} 5.
Eau distillée,	60 gr.
Glycérine,	60 gr.
Alcool,	15 gr.

Le carmin est broyé jusqu'à ce qu'on l'obtienne en poudre très fine; on laisse évaporer l'excès d'ammoniaque à l'air libre (on pourrait également chauffer); on ajoute ensuite la glycérine, puis l'eau et enfin l'ammoniaque; on filtre.

Ranvier estime que ce réactif rend les colorations diffuses; cette diffusion disparaît en lavant après coloration à l'alcool au $1/3$ renfermant quelques gouttes d'acide chlorhydrique. La solution de Beale, délaissée pendant quelque temps, avait pourtant le grand avantage de contenir de l'alcool; ainsi elle s'altérait moins; la pénétration se faisait mieux et l'on ne risquait pas de voir les tissus s'altérer.

CARMIN DE HOYER.

Hoyer, dans la *Biologisches Centralblatt* (1882), a proposé la solution qui se prépare en dissolvant 1 gramme de

carmin dans 1 à 2 centimètres cubes d'ammoniaque liquide, étendus de 6 à 8 centimètres cubes d'eau. On chauffe au bain-marie pour chasser l'excès d'alcali volatil. Quand ce dernier a disparu et que des bulles n'apparaissent plus à la surface du liquide, celui-ci prend une teinte rouge pourpre.

On laisse refroidir et déposer; on filtre, et l'excès de carmin resté insoluble peut être de nouveau employé. Au liquide neutre, on ajoute du chloral hydraté. L'auteur n'indique pas la quantité de ce dernier réactif à employer. Nous formons une solution carminée de 100 centimètres cubes par l'addition d'eau distillée à laquelle nous ajoutons 1 gramme de chloral hydraté.

Mais on peut aussi obtenir le réactif en pâte et en poudre, comme Hoyer l'indique. Pour cela, après avoir filtré et ajouté un peu de chloral, on précipite le carmin par l'addition de 4 à 6 fois son volume d'alcool fort. On retient le précipité sur un filtre et on le lave. Si on sèche, on en obtiendra une poudre. Si l'on désire une pâte, on ajoute de l'alcool, de la glycérine et du chloral. Mais Hoyer n'indique pas quelles sont les quantités de ces réactifs qu'il faut ajouter. Pour 1 gramme de carmin, nous avons employé, pour fabriquer la pâte, 2 c/c d'alcool, 2 c/c de glycérine et 1 gramme de chloral. Comme le dit l'auteur, la poudre et la pâte se conservent pendant longtemps. L'une et l'autre se dissolvent dans l'eau distillée. La première, cependant, s'y dissout mieux. La solution se filtre facilement, ce qui n'est pas le cas pour le carmin ordinaire.

CARMIN OXALIQUE DE THIERSCH.

Solution A.

Carmin,	1 gr.	Le carmin en poudre est broyé avec l'ammoniaque; on ajoute l'eau ensuite.
Ammoniaque,	1 gr.	
Eau,	3 gr.	

Solution B.

Acide oxalique, 1 gr.
Eau, 22 gr.

On prend 1 gramme de la solution *A*
pour 8 grammes de la solution *B*.

On mélange; puis on ajoute 12 gr. d'alcool absolu. Quand il se forme un précipité, on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque.

CARMIN ALUNÉ DE GRENACHER.

Eau distillée, 100 c/c.
Carmin en poudre, 0,5 à 1 gr.
Alun de potasse, 1 à 5 gr.

Le carmin est pulvérisé finement; on fait bouillir le tout pendant 20 à 30 minutes; pendant l'ébullition, on maintient le volume primitif en ajoutant de l'eau; on filtre.

Le carmin aluné de Grenacher est une des solutions aqueuses qui donnent de bonnes colorations. En ajoutant quelques gouttes d'acide phénique dilué, ce réactif se conserve des années. Il colore très bien les noyaux.

DIVERS CARMINS BORACIQUES.

En 1865, Thiersch proposa la formule suivante : (Archiv für mikrosk. anatomie de Schultze.)

Borax,	4 parties en poids.
Eau distillée,	56 parties.
Carmin,	1 partie.

Un volume de cette solution était mélangé avec deux volumes d'alcool absolu. Ce réactif fut employé par l'auteur pour colorer les os et les cartilages traités par l'acide chromique. La solution étant alcoolique, elle avait de grands avantages.

Grenacher a proposé une solution de carmin au borax acidulée par l'acide acétique, qui se prépare comme suit :

Dans une solution contenant de 1 à 2 pour cent de borax on ajoute de $^1/_2$ à $^3/_4$ pour cent de carmin en poudre; on porte à l'ébullition pendant 10 à 20 minutes; on filtre. On ajoute de l'acide acétique jusqu'à commencement de précipitation de carmin; après vingt-quatre heures, on filtre de nouveau. On peut en faire une solution alcoolique en ajoutant la moitié d'alcool à 70°. Sans alcool, le carmin boracique de Grenacher ne doit pas être employé pour colorer *in toto*. Les coupes sont colorées diffusément; après coloration, on lave à l'eau et on décolore par l'alcool à 70° additionné de quelques gouttes d'acide chlorhydrique par 20 c/c.

Le carmin boracique de Grenacher auquel on ajoute la moitié de son volume d'alcool teint bien *in toto*; après coloration, on décolore par l'alcool acide comme il a été indiqué ci-haut.

Il existe d'autres formules de carmin boracique; nous croyons inutile de les passer en revue; le carmin se dissolvant facilement dans une solution bouillante de borax, on peut faire varier les quantités de ces substances qui doivent entrer en solution; celle-ci sera additionnée d'alcool ou d'acide acétique dans des limites variables.

CARMIN BORIQUE ET SALICYLIQUE.

Atti Soc. Toscana Sci. Nat. Proc. verb., IV (1885), p. 233.

Arcangeli a proposé dernièrement quatre formules pour obtenir des réactifs colorants à l'aide du carmin; nous les avons préparés et nous les avons essayés sur divers tissus; ils nous ont donné d'excellents résultats; c'est ce qui nous engage à les faire connaître avec d'autant plus de détails qu'ils ne sont encore décrits dans aucun traité. La manipulation est d'ailleurs très simple.

A. *Carmin borique*. On fait bouillir pendant dix minutes :

100 grammes d'eau distillée,
4 acide borique,
$0^{gr},5$ carmin.

On filtre encore tiède.

La solution est d'un beau rouge cochenille ressemblant à l'éosine. Sur la peau de grenouille, l'épithélium et les fibres musculaires, comme l'auteur le constate d'ailleurs, nous avons obtenu de bons résultats. Nous avons préparé des infusoires, entre autres des *opalines* de l'intestin de la grenouille, en colorant au carmin boracique et en fixant au préalable à

l'acide osmique $^1/_{1000}$ et le chlorure mercurique. Les noyaux se sont très bien colorés.

B. *Carmin aluno-borique*. On fait bouillir pendant 10 à 15 minutes :

100 grammes d'une solution saturée d'alun,
2 grammes d'acide borique,
25 centigrammes carmin.

On filtre comme précédemment; on obtient une dissolution d'un beau rouge violet.

Les noyaux des tissus végétaux et animaux sont teints en 24 heures. Les sections provenant de l'alcool prennent plus rapidement la couleur.

C. *Carmin aluno-salicylique*. En remplaçant dans la formule précédente l'acide borique par l'acide salicylique, on prépare également un excellent réactif. On fait bouillir :

100 grammes d'une solution saturée d'alun,
25 centigrammes acide salicylique,
25 centigrammes carmin.

On filtre et il en résulte un liquide rouge intense, qui colore, comme les réactifs prédédents, les animaux et végétaux.

Une quatrième formule sera décrite avec le picro-carmin.

Voici quelques modifications que nous avons apportées à la formule A, nous basant sur la solubilité de l'acide borique dans l'alcool :

1° Au carmin préparé comme Arcangeli l'indique, nous ajoutons la moitié et même les $^2/_3$ d'alcool.

2° Pendant 15 minutes, nous maintenons à l'ébullition :

75 c/c alcool à 90°.
25 c/c eau distillée.
5 gr. acide borique.
4 décigr. de carmin.

Nous obtenons une solution alcoolique carminée.

3° On peut rendre acide en ajoutant quelques gouttes d'acide acétique.

A l'aide d'une telle solution, on a beaucoup de chance qu'un tissu ne se déformera pas quand on le transporte de l'alcool fort, par exemple, dans le réactif colorant. Si ce dernier est en solution aqueuse, en recevant une pièce à préparer venant de l'alcool, il arrivera que des objets à structure délicate s'altéreront en s'hydratant de nouveau.

Avec le carmin borique alcoolique (comme, d'ailleurs, avec d'autres solutions à l'alcool), on peut, quand il s'agit de remonter la suite des alcools, arrivé à l'alcool à 70°, colorer immédiatement, puis passer à l'alcool à 90°.

Quoique déjà bien nombreux, les réactifs d'Arcangeli prendront place dans nos laboratoires, parce que ces solutions donnent d'excellents résultats. Par leur facilité de préparation et le succès qu'ils permettent d'obtenir, on peut les recommander aux débutants, à qui ils seront certainement très utiles.

Il est à espérer qu'ils se conserveront longtemps sans altération.

CARMIN ACÉTIQUE.

Les alcalis exercent, sur tous les tissus, une action profondément altérante; la moindre quantité d'ammoniaque en

excès dans les solutions carminées est défavorable à la conservation des cellules. Schweiger-Seidel neutralise l'excès d'ammoniaque jusqu'à ce qu'il se forme un léger précipité.

Schneider prépare le carmin acétique en faisant bouillir du carmin pulvérisé avec une petite quantité d'acide acétique à 45 p. c.; après filtration, il ajoute de l'eau, de façon à obtenir une solution contenant 1 p. c. de carmin.

Flemming emploie la solution concentrée.

CARMIN ALCOOLIQUE ACIDE.

Grenacher est l'auteur d'une formule de carmin à la fois alcoolique et acide; dans 50 c/c d'alcool à 60°-70°, il ajoute 3 à 4 gouttes d'acide chlorhydrique concentré; il fait bouillir pendant 10 minutes. Il filtre ensuite.

Mayer, de Naples, emploie 100 c/c d'alcool à 80°; il acidule par 30 gouttes de HCl pur et concentré et il fait bouillir avec cette solution 4 grammes de carmin pulvérisé.

L'ébullition a lieu au bain-marie; il faut une demi-heure pour dissoudre la matière colorante; on filtre ensuite encore chaud; et l'acide en excès est neutralisé par l'ammoniaque. On ajoute ce dernier goutte à goutte, jusqu'à ce qu'il commence à se précipiter.

PICRO-CARMIN DE RANVIER.

Nous l'avons déjà dit, il faut employer autant que possible, pour colorer, des solutions alcooliques. Cependant, on fera usage du picro-carmin, qui donne, quoique en solution dans l'eau, de bonnes colorations, tout en laissant les tissus

intacts. C'est la coloration qui fournira les meilleures préparations au commençant.

Ce réactif doit ses précieuses qualités à l'état de neutralité ou tout au moins à l'absence d'ammoniaque à l'état libre; la présence de l'acide picrique empêche les tissus de s'altérer.

Voici comment Ranvier décrit la préparation du picro-carmin *(Traité de Technique,* page 100) :

« Pour le préparer, on verse dans une solution saturée d'acide picrique du carmin, dissout dans l'ammoniaque jusqu'à saturation, puis on évapore dans une étuve. Après réduction des quatre cinquièmes, la liqueur refroidie abandonne un dépôt peu riche en carmin, qui est séparé par filtration.

» Les eaux mères évaporées donnent le picro-carminate solide sous la forme d'une poudre cristalline de la couleur de l'ocre rouge. Cette poudre doit se dissoudre entièrement dans l'eau distillée; une solution au centième est la plus convenable. »

Un manipulateur habile préparera, sans trop de peine, la formule de Ranvier; mais le débutant se trouvera en présence de difficultés que voici : combien de carmin faut-il employer? quelle est la quantité d'ammoniaque nécessaire? comment trouver que la solution sera saturée en versant de l'acide picrique concentré? Ce n'est qu'après plusieurs essais qu'on arrive à obtenir une solution convenable. Et disons-le, sans cependant vouloir en rien enlever à l'immense mérite de l'auteur, qui a doté les laboratoires d'une trouvaille aussi importante, la recette qui précède ne peut s'adresser aux commençants, auxquels on ne doit indiquer

que des moyens certains, quand il s'agit de réactifs. C'est ce que plusieurs histologistes ont compris. Il était nécessaire de fixer les quantités des différentes substances entrant dans le picro-carmin. *Le picro-carmin doit devenir une liqueur titrée.*

Formule de Gage. (Am. Mont. Mic. Journ., 1880.) Cet auteur a trouvé :

1° Qu'une égale quantité en poids de carmin et d'acide picrique donnait les meilleurs résultats;

2° Que le carmin doit être dissout dans 50 fois son poids d'ammoniaque;

3° Que l'acide picrique doit être dissout dans 100 fois son poids d'eau, en employant la chaleur si c'est nécessaire;

4° Les solutions doivent être mélangées à la température ordinaire; on évapore à sec, à une température de 40 à 45 p. c., au bain-marie ou même à la température ordinaire. On redissout dans l'eau distillée, de manière à ramener au volume de 100.

Exemple : 1 gramme de carmin est dissout dans 50 grammes d'ammoniaque;

1 gramme d'acide picrique est dissout dans 100 grammes d'eau chaude.

On mélange les deux solutions à froid; on filtre et on évapore à sec à 40-45° et au bain-marie (on peut abandonner à l'évaporation lente à l'air libre, mais à l'abri de la poussière). On dissout ce résidu dans 100 parties en poids d'eau. Nous avons employé souvent la méthode de Gage, et nous avons reconnu qu'il est tout à fait inutile d'évaporer à sec. On perd ainsi, en réduisant le liquide, une certaine quantité de carmin et d'acide picrique. La quantité d'ammoniaque est aussi trop forte. A quoi bon employer 50 grammes d'am-

moniaque, alors qu'il faut en faire disparaître plus de la moitié par évaporation?

Formule de Weigert (Virchow, Archiv. 1881). Deux grammes de carmin en poudre sont dissous dans 4 grammes d'ammoniaque. On recouvre le vase où l'on aura fait la dissolution.

Après un repos de 24 heures, on ajoute 200 gr. d'acide picrique concentré, puis un peu d'acide acétique jusqu'à formation d'un précipité après agitation. Ayant laissé reposer 24 heures, on filtre; on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque si le liquide n'était pas clair.

En comparant les deux moyens précédents, on voit que les deux auteurs ont indiqué en somme des procédés qui ne diffèrent que dans la manipulation. Dans les deux cas, on obtient une solution picrique carminée contenant $^1/_{100}$ de substance colorante. Weigert propose une dissolution concentrée d'acide picrique à la température ordinaire (soit à 15 degrés); or, une telle solution contient ainsi environ 2 gr. 3 d'acide picrique, donc la quantité d'acide picrique équivaut à peu près à celle de carmin employé; c'est la formule de Gage.

La formule de Weigert nous paraît la meilleure; c'est celle qui nous a donné les meilleures préparations.

La quantité 4 gr. d'ammoniaque employée par Weigert est trop faible; en mélangeant les deux solutions, il se forme tout de suite un précipité; il faut au moins 10 gr. d'alcali volatil. Pour ramener le liquide à la neutralisation, il vaut mieux, au lieu de saturer l'excès d'alcali par l'acide acétique, laisser échapper l'excès à l'air libre; il suffit pour cela de laisser le flacon débouché.

En résumé, voici comment nous appliquons avec succès la formule de Weigert : à 2 gr. de carmin pulvérisé dans un mortier, nous ajoutons 10 c/c d'ammoniaque; nous mélangeons avec soin; nous laissons reposer un quart d'heure et nous ajoutons, par petites portions et en agitant vivement, 200 gr. d'une solution concentrée d'acide picrique que nous obtenons en dissolvant à chaud 2 gr. d'acide picrique dans 200 gr. d'eau chaude. Nous n'ajoutons ce dernier liquide que quand il est froid; en ceci nous imitons la formule de Gage.

Quant à l'évaporation à sec, comme le conseillent Ranvier, Gage et d'autres auteurs, c'est là une manipulation inutile; pourquoi faire évaporer l'eau qui, après, devra être ajoutée de nouveau? Si cette opération a pour but de faire disparaître une certaine quantité ou de carmin ou d'acide picrique, il suffit, dès le commencement, de n'ajouter que la quantité nécessaire de ces substances. Pour enlever l'ammoniaque, il n'est pas nécessaire d'amener à siccité.

L'ammoniaque disparue, si on laisse le flacon à picro-carmin ouvert il s'y forme rapidement des moisissures. Nous avons remarqué que le liquide avait alors des qualités supérieures après la fermentation qui s'opère ainsi. Aussi, nous soumettons maintenant le picro-carmin à cette opération, et nous l'arrêtons quand les champignons forment une trame assez épaisse à la surface. Nous filtrons ensuite, et pour empêcher une nouvelle putréfaction, nous ajoutons, à l'exemple de Mayer, un petit cristal de thymol ou bien, comme le conseille Hoyer, 1 p. c. d'hydrate de chloral.

Hoyer propose aussi une solution de carmin picrique, obtenue avec la poudre de carmin préparée comme nous

venons de l'indiquer plus haut. Il la dissout dans une solution de picrate ammonique. Mais le picrate d'ammoniaque est une substance qu'il n'est pas possible d'avoir constamment sous la main. C'est pourquoi nous avons modifié comme suit la préparation du carmin picrique de Hoyer (ce dernier, d'ailleurs, ne donne aucune proportion exacte pour composer sa liqueur colorante).

Nous dissolvons un gramme de carmin dans 5 à 7 centimètres cubes d'ammoniaque concentrée, étendus d'autant d'eau. Dans 50 centimètres cubes d'eau distillée, nous dissolvons à chaud 1 gramme d'acide picrique; nous mélangeons les deux solutions et nous étendons de façon à former 100 centimètres cubes; nous ajoutons alors au liquide obtenu 1 gramme de chloral hydraté. S'il reste de l'ammoniaque libre, nous chauffons doucement au bain-marie pour en faire disparaître l'excès, ou bien nous laissons volatiliser l'alcali en abandonnant le liquide à l'air libre.

Cette solution de carmin picrique donne de jolies teintes aux tissus végétaux et animaux; elles se conserve longtemps sans s'altérer.

Pergens, élève de Carnoy (1), propose la formule suivante pour préparer le picro-carmin :

1° Faire bouillir pendant 2 h. 1/2, 500 gr. cochenille en poudre avec 30 litres d'eau; ajouter 50 gr. nitrate de K et, après peu d'instants d'ébullition, 60 gr. oxalate de K. L'ébullition est maintenue pendant un quart d'heure. Après refroidissement, le carmin se dépose; il est lavé plusieurs fois à l'eau distillée; cette opération dure 3 à 4 semaines.

(1) *La Biologie cellulaire*, par Carnoy. Louvain, 1884.

Nous voyons que cette préparation du carmin est celle publiée par Mme Genette (*Dictionnaire de chimie de Wurtz*, t. I, p. 768). Nous en avons parlé plus haut de cette recette.

Préparer ainsi son carmin soi-même, c'est très bien; mais n'est-ce pas là une perte de temps, puisqu'on peut avoir à un prix raisonnable cette substance dans le commerce!

2° La seconde partie de la préparation mérite d'être décrite, parce qu'elle nous paraît devoir fournir de bons résultats. Carnoy l'affirme également : sur le carmin, on verse un mélange de 1 volume d'ammoniaque et 4 volumes d'eau en maintenant le carmin en excès; après deux jours, filtration et exposition à l'air jusqu'à formation de précipité; on filtre de nouveau; on y verse une solution concentrée d'acide picrique; après 24 heures de repos, on ajoute 1 gr. de chloral par litre de liquide.

Mayer prépare le picro-carmin en dissolvant 2 gr. de carmin en poudre mélangé de 25 c/c d'eau, puis assez d'ammoniaque pour dissoudre; il ajoute 4 volumes d'une dissolution d'acide picrique dans l'eau; ou bien, il ajoute ce dernier liquide jusqu'à ce qu'il se forme un précipité.

Arcangeli vient de faire connaître qu'on obtient une solution colorante en faisant bouillir pendant 10 minutes :

25 centigrammes de carmin,

50 c/c d'une solution saturée d'acide picrique.

RÉACTIFS PRÉPARÉS PAR LA COCHENILLE.

Solution de cochenille de Czokor.

Sept grammes de cochenille sont pulvérisés avec 7 grammes d'alun calciné; on ajoute 700 c/c d'eau distillée; on fait

bouillir et on amène à 100 c/c par évaporation; on filtre et on ajoute une goutte d'acide phénique.

Ce réactif est analogue au carmin aluné de Gerlach; il rendra des services aux commençants.

SOLUTION ALCOOLIQUE DE COCHENILLE DE MAYER.

A 1 gramme de cochenille, on ajoute 8 à 10 c/c d'alcool à 70°; on laisse macérer plusieurs jours, puis on filtre.

Les objets sortant de l'alcool à 70° y sont rapidement colorés ; en cas de surcoloration, on traite par l'alcool à 70°, légèrement acidulé d'acide chlorhydrique.

BOIS DE CAMPÊCHE, HÉMATOXYLINE ET RÉACTIFS COLORANTS QUI EN DÉRIVENT.

L'hématoxyline est le principe colorant du bois de campêche (hæmatoxylon campechianum). Elle a été découverte par Chevreul, qui l'a obtenue en cristaux, en épuisant par l'alcool le résidu évaporé à sec d'un extrait aqueux de campêche. Erdman l'a préparée en traitant le bois ou le résidu sec de l'extrait aqueux par l'éther en présence du sable quartzeux. La décoction concentrée donne, au bout de quelques semaines, des cristaux que l'on purifie par plusieurs cristallisations.

Les cristaux de l'hématoxyline sont d'un jaune clair ; ils se dissolvent en petite quantité dans l'eau froide ; dans l'éther et dans l'eau bouillante, la dissolution se fait beaucoup mieux.

L'hématoxyline peut s'employer après durcissement dans

l'acide chromique, le chromate de K et autres réactifs analogues. Elle teint encore facilement les tissus après l'acide osmique et l'emploi du nitrate d'argent. Elle colore rapidement, et le débutant fera bien de suivre la marche de l'opération sous le microscope, afin de ne pas avoir surcoloration.

SOLUTION D'HÉMATOXYLINE DE KLEINENBERG.

Balfour et Forster, dans leurs *Éléments d'embryologie* (traducteur, E. Rochefort), 1877, ont donné la formule suivante due à Kleinenberg :

1° Faire une solution saturée de chlorure de calcium cristallisé dans l'alcool à 70°; puis, ajouter de l'alun jusqu'à saturation ;

2° Faire également une solution saturée d'alun dans l'alcool à 70° et mélanger la première à la seconde dans le rapport 1 est à 8 ;

3° Au mélange ainsi formé des deux premières solutions, ajouter quelques gouttes d'une solution saturée d'hématoxyline dans l'alcool absolu et simplement alcaliné.

Les objets sont placés dans ce dernier liquide à leur sortie de l'alcool absolu ; il faut qu'ils soient libres de tout acide.

SOLUTION DE KLEINENBERG MODIFIÉE PAR MAYER.

1re solution. On sature de l'alcool à 70° par du chlorure de calcium, on ajoute un peu d'alun ; puis on filtre.

2e solution. A un volume de la solution 1, on ajoute 6 à 8 volumes d'alcool à 70°.

3e solution. Quand on veut colorer, on ajoute quelques gouttes d'une solution concentrée d'hématoxyline à une quantité suffisante de la solution 2 ; on obtient ainsi une coloration d'un bleu violet.

Les petits objets doivent être teints par de faibles solutions colorantes obtenues ainsi. Après coloration, on transporte dans l'alcool à 90° ; s'il y a surcoloration, on décolore par une dissolution faible ($^1/_2$ p. c. au moins) d'acide oxalique ou d'acide chlorhydrique.

SOLUTION D'HÉMATOXYLINE DE BOEHMER.

Solution A.

Hématoxyline,	0,35.
Alcool absolu,	10,00.

Solution B.

Alun,	1,00.
Eau distillée,	300,00.

Quand on veut colorer, on prend une certaine quantité de la solution B dans un verre de montre. On ajoute quelques gouttes de la solution A ; on obtient une liqueur d'un bleu violet ; il faut avoir soin de ne pas la faire trop intense, car la coloration se fait rapidement ; en cas de surcoloration, agir comme il est indiqué ci-haut.

SOLUTION D'HÉMATOXYLINE DE GRENACHER.

A 100 c/c d'une solution concentrée d'alun ammoniacal, on ajoute :

4 c/c d'une solution concentrée d'hématoxyline dans l'alcool absolu.

On laisse reposer huit jours à la lumière.

On ajoute 25 centimètres cubes d'alcool méthylique et autant de glycérine.

Flemming a employé ce réactif pour étudier les noyaux. (*Zelbsubstanz*, etc.)

Il n'est pas toujours facile de se procurer l'hématoxyline; elle peut manquer dans les laboratoires. Le débutant ne se trouvera peut-être pas disposé à consacrer beaucoup d'argent à l'achat des réactifs; c'est pourquoi nous allons indiquer le moyen de se fabriquer une excellente solution qui équivaudra, à peu de chose près, à celles que nous venons de décrire.

1. On se procure chez le droguiste 5 grammes d'extrait de campêche que l'on broie finement et on les fait macérer dans l'alcool à 90°, ou même absolu, ce qui vaut mieux.

2. On fait une dissolution aqueuse d'alun de potasse contenant $^1/_{200}$ de cette substance.

Quand on voudra colorer des coupes ou d'autres objets, on versera de la solution 2 dans un verre de montre et on ajoutera goutte à goutte de la solution 1, jusqu'à ce qu'il se forme une coloration d'un bleu-violet (s'il se formait un précipité, on filtrerait sur un très petit filtre).

On peut même employer la solution 1 avec le chlorure de calcium dissout dans l'alcool à 70° et l'alun, comme l'indique Kleinenberg.

Enfin, on ferait encore la solution d'hématoxyline en mettant macérer 15 gr. de bois de campêche avec 1 litre

d'eau bouillante, que l'on maintient à 100°, en chauffant pendant plusieurs heures; on filtre et on évapore à sec; on reprend le résidu par 50 c/c d'alcool à 90°; après plusieurs jours, on filtre.

On emploie cette solution, au lieu de l'hématoxyline dissoute dans l'alcool absolu, dans les différentes formules indiquées plus haut.

CONSEILS RELATIFS AUX LIQUIDES COLORANTS QUI PRÉCÈDENT.

Nous avons donné un nombre assez considérable de formules pour préparer les réactifs carminés. Le commençant n'aura à s'occuper dans les débuts que de quelques-unes de ces solutions.

Il se servira d'abord du picro-carmin, qu'il obtiendra en suivant les conseils que nous avons donnés précédemment et en consultant le tableau détaillé qui suit. Il fera également usage du carmin boracique de Grenacher en solution aqueuse et en solution alcoolique. La teinture de cochenille Czokor lui sera aussi très utile; il en est de même de la cochenille alcoolique de Mayer. Enfin, un quatrième colorant complètera la série qui est indispensable pour aborder l'étude de l'histologie et de l'anatomie comparée. Après quelques semaines de travail, la solution d'hématoxyline de Bœhmer sera essayée; on adoptera la recette au bois de campêche que nous avons donnée, si l'on n'a pas d'hématoxyline en cristaux.

Nous estimons qu'il n'est pas nécessaire, en lisant ce Manuel, de s'inquiéter, dans le principe, de toutes les formules de teinture qui y sont décrites; par la suite, cepen-

dant, elles deviendront nécessaires. Si l'on veut travailler avec succès et ne pas s'exposer à des mécomptes, on n'utilisera, pendant un certain temps, que le petit nombre de solutions que nous venons d'indiquer.

Plus tard et à mesure que l'on progressera et que l'on sentira la nécessité de le faire dans les recherches originales, on complètera la série des colorants que nous avons décrits.

Nous croyons que l'acide carminique s'imposera aux histologistes quand ses propriétés seront mieux connues et que son emploi sera généralisé. C'est une substance fixe et déterminée; en en employant une certaine quantité dans une solution, on possède une liqueur titrée en quelque sorte. Avec le carmin, il n'en est pas ainsi; des quantités égales de deux carmins différents peuvent contenir plus ou moins de matières colorantes et donner, par conséquent, des résultats très différents. Ces inconvénients sont écartés avec l'acide carminique. Aussi, lorsque l'on aura suffisamment acquis la pratique des manipulations, nous recommandons d'essayer cette substance à l'aide de laquelle, par quelques gouttes d'ammoniaque, on aura en solution soit aqueuse, soit alcoolique, le carminate d'ammoniaque. En mélangeant celui-ci à l'acide picrique pour saturer l'excès d'alcali, on aura le picro-carmin. L'acide carminique en solution alcoolique et en solution aqueuse est également bien acidulé par l'acide acétique.

Quant à la préparation de l'acide carminique, elle n'a rien de difficile. On se guidera pour l'obtenir sur le tableau qui suit.

TABLEAU DES MANIPULATIONS POUR LA PRÉPARATION DES RÉACTIFS COLORANTS DANS LE DÉBUT DES ÉTUDES.

PICRO-CARMIN.

A. 1. Peser 1 gramme carmin finement pulvérisé.
2. Dissoudre dans 10 c/c d'ammoniaque; laisser agir une heure.

B. 1. Peser 1 gramme acide picrique.
2. Dissoudre dans 100 c/c d'eau chaude; laisser refroidir.

C. Mélanger les deux solutions A et B.

D. S'il reste de l'ammoniaque libre, ce que l'on perçoit par l'odeur, on la fait disparaître au bain-marie à une température ne dépassant pas 40°. Il est, d'ailleurs, toujours bon de chauffer; car, par l'odorat, il arriverait qu'une petite quantité d'ammoniaque ne soit pas perçue.

E. On laisse reposer et on filtre; on ajoute 1/2 gramme de chloral hydraté.

SOLUTION DE COCHENILLE.

a) Peser 7 grammes de cochenille finement pulvérisée.
b) Peser 7 grammes d'alun en poudre.
c) Dans une capsule ou un récipient en tôle émaillée contenant 700 c/c d'eau, ajouter *a* et *b*.
d) Faire bouillir jusqu'à réduction du volume à 400 c/c.
e) Filtrer et ajouter une goutte d'acide phénique.

SOLUTION DE COCHENILLE DE MAYER.

a) Peser un gramme de cochenille en poudre.
b) Faire macérer avec 10 c/c d'alcool à 70° pendant trois jours.
c) Filtrer.

CARMIN BORIQUE.

A. *a)* Peser 4 grammes acide borique.
b) Peser 5 décigrammes carmin.
B. Faire bouillir pendant dix minutes avec 100 c/c d'eau.
C. Filtrer.

SOLUTION HÉMATOXYLIQUE.

A. *a)* Peser 0,gr35 hématoxyline.
b) Faire dissoudre dans 10 c/c alcool absolu.
B. Faire une dissolution d'alun dans l'eau à $^{1}/_{300}$.
C. Quand on veut colorer, verser dans un verre de montre le liquide B, puis quelques gouttes de A jusqu'à coloration bleu-violet.

SUCCÉDANÉ DE L'HÉMATOXYLINE.

A. *a)* 15 grammes de bois de campêche sont ajoutés à
b) 1 litre d'eau.
c) On maintient à l'ébullition pendant plusieurs heures.
d) Filtrer à travers un linge; puis, sur du papier.
e) Évaporer le filtrat à sec.

f) Répandre le résidu obtenu en *e* par 50 c/c d'alcool à 90°.

g) Filtrer après plusieurs jours de repos.

B. Faire une solution d'alun à $^1/_{300}$.

C. Pour colorer, verser la solution B dans un verre de montre et ajouter goutte à goutte A jusqu'à coloration bleu-violet.

ACIDE CARMINIQUE.

A. Faire bouillir 30 grammes cochenille pulvérisée avec un litre d'eau pendant plusieurs heures, ajouter de temps en temps de l'eau pour remplacer le liquide qui s'évapore.

B. 1. Après un repos d'un quart d'heure, passer le liquide clair à travers un linge; 2. ajouter encore à la boue de cochenille, qui se trouve dans le récipient, $^1/_2$ litre d'eau bouillante; filtrer.

C. Au liquide obtenu en B 1 et B 2 réunis, ajouter solution aqueuse et acidulée par acide acétique d'acétate de plomb jusqu'à ce qu'il se forme un précipité; — (pour cela, il faut dissoudre 10 gr. d'acétate de plomb).

D. *a)* Laisser déposer le précipité qui est d'un bleu-violet.

b) Le précipité s'étant déposé et le liquide surnageant étant clair, on jette ce dernier sur un filtre.

c) On ajoute un peu d'eau distillée au précipité; on agite; on laisse déposer; puis on verse le tout sur le filtre en commençant par le liquide.

E. Faire une solution aqueuse d'acide sulfurique au $^1/_{15}$.

F. *a)* On traite le précipité obtenu en D par l'acide sulfurique dilué en versant doucement ce dernier.

b) Il se forme une coloration rougeâtre, mais dans la masse que l'on agite, on voit encore une coloration violette, qui disparaît à mesure que l'on verse l'acide. Avoir soin de ne pas ajouter trop d'acide. Il vaut encore mieux laisser un peu de carminate de P*b* non décomposé que de risquer d'ajouter SO^4H^2 en excès.

c) Laisser déposer le précipité de sulfate de plomb et verser le liquide clair sur un filtre.

1° On peut conserver ainsi le liquide en solution aqueuse.

2° Ou bien à une petite partie ajouter de l'ammoniaque pour obtenir le carminate d'ammoniaque.

G. Il est préférable d'évaporer l'acide carminique obtenu en F*c* jusqu'à dessiccation complète; cette opération se fait au bain-marie.

I. Peser $0^{gr}25$ acide carminique en cristaux obtenu en G et dissoudre dans 100 c/c alcool à 80 c/c.

Solution aqueuse.

Conserver 50 c/c de la liqueur obtenue en F*c* 1°.

Carminate neutre d'ammoniaque.

A 25 c/c ajouter 1 goutte d'ammoniaque.

Acide picro-carminique.

A 25 c/c ajouter 5 gouttes ammoniaque et verser 5 c/c solution concentrée d'acide picrique.

RÉACTIFS COLORANTS DÉRIVÉS DE L'ANILINE OU DE LA SÉRIE AROMATIQUE.

Ces réactifs ne sont pas ceux qui conviennent aux débuts des études histologiques. On en fera seulement usage quand on saura manier les principaux liquides carminés. Les dérivés de l'aniline n'ont pas une élection pour les tissus telle que l'on puisse obtenir des différenciations convenables : les teintes qu'ils donnent sont presque toujours uniformes.

Cependant, en employant l'excellente méthode de Hermann et Flemming, on peut obtenir la coloration des noyaux seule. Ce moyen n'est malheureusement applicable qu'aux petits objets et aux coupes. Les pièces que l'on veut traiter ainsi sont d'abord fixées par une solution d'acide chromique à $^{1}/_{10}$ à $^{5}/_{10}$ pour cent. On les lave à l'eau distillée ; elles sont ensuite transportées dans une solution d'aniline (safranine, rose de naphtaline, mauvéine, éosine, vert solide de fuschine, etc.). La teinte se produit après douze à vingt-quatre heures dans de petites quantités de solutions ; celles-ci sont dans l'alcool absolu auquel on ajoute pour l'usage la moitié d'eau distillée. Après un séjour de vingt-quatre heures dans l'alcool absolu, on lave à l'alcool ordinaire, on les remet dans l'alcool absolu. Le verre dans lequel on les manipule est sur un fond blanc ; on agite jusqu'à ce qu'il ne s'échappe plus de couleur des objets. On monte ensuite dans le *dammar* après avoir clarifié par l'essence de girofle. Les résultats les meilleurs sont obtenus avec la safranine, le rouge de magdala ou le dahlia. Les couleurs d'aniline sont ordinairement en solution alcoolique à $^{1}/_{100}$; pour l'usage, on les dilue suivant les

besoins. Les coupes ou les objets soumis aux couleurs d'aniline sont montés dans le baume après déshydratation dans l'alcool absolu et clarification par l'essence de clou de girofle.

Nous allons passer en revue les principales couleurs introduites en histologie. Nous donnons d'abord un tableau d'après Harris qui pourra servir de guide pour les dissolutions.

C'est dans les doubles et multiples colorations que les couleurs d'aniline trouvent une nouvelle et ingénieuse application.

BRUN DE BISMARCK DE WEIGERT.

(Arch. Mikrosp. anat., 1878.)

Une solution saturée de brun de Bismarck en poudre est obtenue par l'eau bouillante ou par l'alcool faible. Mayer le dissout dans l'alcool à 70 p. c. On colore sans diluer la solution. On filtre de temps en temps.

Ce réactif est utilisé avec succès après la fixation par l'alcool et l'acide chromique. La coloration a lieu en quelques minutes. On lave à l'alcool et on monte dans le baume après clarification dans l'essence de girofle. Henneguy a trouvé qu'une solution faible de brun de Bismarck colorait les infusoires et, entre autres, le *Paramœcium aurelia.* Injecté en dose convenable sous la peau de la grenouille, ce réactif teint les tissus vivants après quelque temps, sans que l'animal paraisse incommodé. Cette substance a donc la propriété *de colorer le protoplasme vivant.*

TABLEAU DES PLUS IMPORTANTES COULEURS D'ANILINE SOLUBLES DANS L'EAU ET DANS L'ALCOOL

(D'APRÈS HARRIS).

(Quart. Journ. Miscr. Sc. XIII, 1885.)

Brun	Rouge	Orange	Jaune	Vert	Bleu	Violet
Brun de Bismarck. Partiellement soluble dans l'alcool dilué. *Vésuvine.* Soluble dans l'eau. *Chrysoïdine.* Soluble dans l'eau.	*Eosine.* Soluble dans l'eau. *Aniline.* Écarlate insoluble dans l'eau; soluble dans l'alcool méthylique. *Flamingo.* Rouge brun, en partie soluble dans l'eau; soluble dans l'alcool méthylique. *Ponceau.* Rouge cramoisi foncé, en partie soluble dans l'eau; soluble dans l'alcool dilué (méthylique). *Rosaniline.* En partie soluble dans l'eau; soluble dans l'alcool méthylique et éthylique. *Fusehine.* Comme la rosaniline.	*Aurine.* Insoluble dans l'eau; légèrement soluble dans l'esprit fort; plus soluble dans l'alcool absolu. *Aniline* orange. — (Comme l'aurine.) *Tropœoline.* D'un jaune écailleux foncé en partie soluble dans l'eau; plus soluble dans l'alcool méthylique. *Phosphine.* Jaune orange; partiellement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'esprit. *Safranine.* Soluble dans l'eau et dans l'alcool.	*Fluoreseine.* Jaune verdâtre; insoluble dans l'eau, soluble dans l'esprit; la solution possède une belle fluorescence. *Jaune d'aniline.* Seulement partiellement soluble dans l'alcool méthylique.	*Vert d'iode.* Vert bleuâtre soluble dans l'eau et dans l'esprit. *Vert malachite.* Un peu vert bleuâtre, soluble dans l'eau comme le précédent.	*Aniline.* Soluble dans l'eau. *Bleu de Lyon.* Insoluble dans l'eau, soluble dans l'esprit fort. *Bleu de Méthyle.* Bleu très foncé soluble dans l'eau et l'esprit. *Bleu de Chine.* Soluble dans l'eau. *Bleu serge.* Comme le bleu de Chine. *Bleu noir.* Soluble dans l'eau.	*Violet d'Hoffmann.* Soluble dans l'eau et dans l'aleool dilué. *Violet de Méthyle.* Le rouge prédomine. En partie soluble dans l'eau et soluble dans l'alcool. *Violet de gentiane.* Bleu prédominant, soluble dans l'eau. *Bleu Tyrrien.* Voisin du violet, soluble dans l'eau. *Poupre de Spillet.* Soluble daus l'esprit.

ÉOSINE.

L'éosine, autrefois très en vogue dans les laboratoires, est soluble dans l'eau et l'alcool; elle teint rapidement en rose, elle n'a pas d'élection, et la coloration est uniforme.

L'éosine commerciale est dissoute dans l'eau à $^1/_{10}$ ou $^1/_{20}$. Pour colorer, on verse quelques gouttes de la solution dans un verre de montre contenant de l'alcool à 70° ou de l'eau.

Lang en fait usage en combinaison avec le picro-carmin; voici comment. On mélange :

50 parties de picro-carmin à 1 p. c.,
50 parties d'éosine à 2 p. c.

Les objets sont immergés dans la solution qui précède, pendant deux jours; l'acide picrique est enlevé par des lavages à l'alcool à 70°. Cette méthode ingénieuse s'applique avec beaucoup de succès aux *plathelminthes* et surtout aux *turbellariés*; elle nous a donné de belles préparations avec certains *némertiens*.

SAFRANINE.

(*Pfitzner, Morph. Jahrb.*, vol. VI.)

On dissout 1 partie de safranine dans 100 parties d'alcool absolu.

Après quelques jours, on ajoute 200 parties d'eau distillée. Ce réactif met en évidence les noyaux en les teignant avec plus d'intensité que le reste de la cellule; même après l'acide chromique, l'action colorante se produit fort bien : c'est là un grand avantage.

VERT D'IODE.

(Vert d'Hoffmann.)

Solution de Griesbach :

Vert d'iode cristallisé, 0,^{gr}1.

Eau distillée, 35 grammes.

Ces proportions peuvent varier. On teint très bien après fixation à l'acide chromique.

VERT DE MÉTHYLE.

En solution alcoolique à $^1/_{100}$.

Carnoy (Biologie cellulaire) recommande ce réactif : 100 parties d'une solution assez concentrée sont acidulées par $^1/_{100}$ d'acide acétique glacial.

BLEU DE QUINOLÉINE.

Ranvier prépare la solution de ce réactif en le dissolvant dans l'alcool à 36° de Cartier et il étend d'eau ; il faut avoir soin de ne faire cette addition d'eau que quand la substance est bien dissoute dans l'alcool.

Le bleu de quinoléine en solution dans l'eau à $^1/_{100000}$ colore *les infusoires vivants*. M. Certes est parvenu le premier à ce beau résultat. Ces animaux vivent assez longtemps dans cette solution, qui doit être faite non pas dans l'eau distillée, mais dans l'eau ordinaire.

La vésuvine, le violet de Méthyle, la fuschine,. etc., donneront également des teintes convenables aux tissus, suivant

les circonstances. On traitera les petits objets par la méthode de Flemming. Autant que possible, c'est en solution alcoolique qu'on les emploiera. Sauf avis contraire, ces couleurs d'aniline seront diluées à $^1/_{100}$. Pour traiter les objets, on versera de l'alcool à 70° dans un verre de montre, puis quelques gouttes de la solution d'aniline.

Quand on saura manier les réactifs carminés, on fera usage des couleurs d'aniline en choisissant d'abord la safranine, le brun de Bismarck, le vert de Méthyle et le bleu de quinoléine.

RÉACTIFS COLORANTS DONNANT DES TEINTES MULTIPLES.

En colorant par le picro-carmin, il arrive souvent que certains éléments se colorent en rose, tandis que d'autres prennent la teinte jaune de l'acide picrique. C'est là un double effet qui produit de très utiles différenciations dans les tissus. Dans ces derniers temps, on a proposé des colorations donnant des résultats bien plus tranchés ; ainsi, tandis que l'on obtient une coloration bleue pour tels éléments, d'autres éléments se teignent en rouge vif. Pour des préparations démonstratives destinées à l'enseignement, cette façon tranchée de faire ressortir, par des couleurs différentes, divers éléments est excellente. Jusqu'à ce moment, à part la double teinte du picro-carmin et quelques autres, on n'a pas beaucoup d'exemples d'auteurs qui aient élucidé une question scientifique par la méthode des doubles colorations. Sans vouloir prétendre que ces moyens n'ont pas leur importance, nous croyons, cependant, devoir prévenir les débutants qu'ils ont peu de chose à apprendre en se servant

de ces procédés, qui donneront, sans doute, de belles préparations, très agréables à l'œil, mais qui n'auront, au point de vue scientifique, que peu de valeur.

Il nous semble, pourtant, que ce Traité serait incomplet, si nous ne faisions connaître les formules qui ont un certain renom et qui donnent d'assez bonnes colorations. Nous avons parlé antérieurement du picro-carmin, dont les résultats sont si précieux ; quand on veut la double teinte très prononcée, il faut avoir soin de ne pas enlever par des lavages l'acide picrique qui colore en jaune. Pour n'obtenir qu'une seule teinte, il faut, au contraire, changer d'alcool jusqu'à ce qu'il ne se produise plus de coloration jaunâtre avec ce dernier réactif.

DOUBLE COLORATION PAR LE CARMIN D'INDIGO ET LE CARMIN BORACIQUE.

L'American Journal of de Medical Sciences, dans son numéro de janvier 1877, donne une formule de double coloration par le carmin d'indigo et le carmin boracique ; elle est due à Merkel, qui en fait usage depuis 1874.

On fait bouillir :

Solution A.

0 gr. 88 de carmin.
3 gr. 54 de borax.
95 gr. d'eau... *On filtre.*

De même :

Solution B.

0 gr. 88 de carmin d'indigo.
3 gr. 54 de borax.
95 gr. d'eau... *On filtre.*

Pour l'usage, on mélange parties égales des solutions A et B. Les objets seront durcis par l'acide chromique et lavés jusqu'à disparition de ce réactif; on immerge dans le colorant pendant un quart d'heure; on lave ensuite par une solution concentrée d'acide oxalique, puis par l'eau, et on monte dans le baume.

On peut faire usage du carmin boracique, qui a été indiqué antérieurement, et préparer une solution analogue avec le carmin d'indigo, suivant les mêmes proportions; seulement, le carmin est remplacé par l'indigo; on mélange parties égales des deux solutions. On peut également colorer successivement en commençant par le carmin boracique.

BLEU DE PRUSSE SOLUBLE ET SAFRANINE.

Le D[r] J. Brun propose le moyen suivant pour teindre en rouge et bleu simultanément les vers intestinaux et certains animaux :

Solution A. — *Bleu.*

Bleu de Prusse, 1 gr. }
Acide oxalique, 0 gr. 25 } On mélange avec une petite quantité d'eau et on ajoute, après solution, 100 gr. eau distillée; on filtre.

Solution B. — *Rouge.*

Alun de potasse, 0 gr. 50 }
Eau, 100 gr. } On dissout et on ajoute safranine 0 gr. 50 dissoute dans 10 gr. d'alcool; on filtre.

Les objets lavés à l'eau sont placés dans la solution A

pendant 10 minutes, puis lavés à l'eau distillée et transférés dans la solution B.

Quant aux couleurs d'aniline proposées pour obtenir des doubles teintes, elles sont nombreuses. Nous donnerons quelques formules, parmi lesquelles figurent principalement celles que le Dr Heinrich List a fait connaître dans le premier fascicule de l'année 1885 des *Zeitschrift für Wissen. Mikrosk.*

BRUN DE BISMARCK ET VERT DE MÉTHYLE (*List*).

Le brun de Bismarck et le vert de Méthyle sont préparés par la méthode de Weigert, c'est-à-dire en dissolvant 1 gramme de substance colorante dans 100 grammes d'eau distillée. Les coupes sont placées dans cette solution pendant un espace de temps variant entre quelques minutes et une heure. On les lave et on les place dans le vert de Méthyle; on les y laisse jusqu'à ce qu'elles soient colorées en vert foncé, puis on les lave à l'alcool absolu. L'expérience est le seul guide pour savoir quand elles doivent être enlevées de l'alcool absolu. On traite par l'essence de bergamote, le xylol, etc., et on monte dans le baume. Les noyaux se colorent en vert foncé, mais la substance des cellules de l'épithélium et le tissu conjonctif se colorent en vert pâle.

BRUN DE BISMARCK ET ANILINE VERTE (*List*).

On emploie en réactifs de la même façon que dans la précédente formule.

ÉOSINE ET VERT DE MÉTHYLE *(List)*.

Calberla dissout 1 partie d'éosine et 60 parties de vert de Méthyle dans 30 p. c. d'alcool chaud. List place d'abord les sections dans une solution alcaline, 5 c/c d'éosine (0,5 gramme pour 100 c/c d'eau distillée), avec 15 c/c d'alcool absolu, puis dans le vert de Méthyle. Deux à cinq minutes suffisent pour colorer; les pièces sont ensuite lavées à l'alcool absolu, que l'on renouvelle jusqu'à disparition de l'éosine dans ce liquide. Cette méthode est recommandée pour les *épithéliums, les membranes muqueuses et le cartilage*.

ÉOSINE ET ANILINE VERTE.

Schiefferdecker a le premier proposé cette méthode de double teinte. List a apporté les modifications suivantes pour l'étude *des glandes* et *du cartilage*. Il fait, comme précédemment, une solution d'éosine dans l'eau distillée à 0,5 p. c.

5 c/c du liquide ainsi préparé sont dissous dans 15 c/c d'alcool absolu. Les pièces sont placées pendant cinquante minutes dans cette solution, et après lavage à l'alcool, on les colore par la solution d'aniline verte. Elles y restent 50 minutes, puis elles sont lavées à l'alcool. Elles sont montées comme il est indiqué ci-dessus.

HÉMATOXYLINE ET ÉOSINE.

List a modifié la méthode de Renaut. Trois à quatre gouttes d'hématoxyline glycérinée sont mélangées à 250

grammes d'eau. Les coupes y sont plongées pendant 24 heures. Elles sont transférées dans une solution d'éosine comme pour les deux colorations précédentes (quelques minutes); elles sont lavées à l'alcool et éclaircies et clarifiées comme précédemment.

HÉMATOXYLINE GLYCÉRINÉE ET NITRATE DE ROSANILINE.

Les coupes sont placées dans l'hématoxyline diluée comme précédemment (24 heures); puis on les colore (10 minutes) par le nitrate de rosaniline en solution. On lave à l'eau, puis on déshydrate et on clarifie comme à l'ordinaire.

VERT DE MÉTHYLE ET NITRATE DE ROSANILINE.

Les coupes sont colorées avec la solution de vert de Méthyle, dont il a été question plus haut (10 minutes); elles sont lavées et placées dans une solution de rosaniline (50 minutes). Laver, déshydrater et clarifier.

Cette méthode peut être modifiée en prenant des solutions plus diluées; les teintes ne se font alors qu'en 24 heures. List emploie toujours l'alcool absolu; il fait usage du liquide de Müller ou de l'acide chromique pour fixer et durcir.

BLEU DE MÉTHYLÈNE ET FUSCHINE.

Le Dr Sahli *(Zeitsch. f. Wiss. Mikros., 1885)* fait connaître une excellente méthode pour colorer en bleu et en rouge simultanément.

Les coupes immergées quelques minutes dans l'eau sont placées pendant plusieurs heures dans une solution aqueuse et concentrée de bleu de méthylène; elles sont lavées à l'eau et portées dans une solution acide de fuschine pendant quelques minutes. Elles sont lavées à l'eau avec soin et placées dans l'alcool contenant $^1/_{100}$ de potasse caustique (quelques secondes); elles sont immergées dans une grande quantité d'eau. Sur des coupes de la *moelle*, la substance blanche apparaît colorée en bleu-violet, tandis que la substance blanche est teinte en rouge.

PICRO-CARMIN ET COULEURS D'ANILINE.

Stirling *(Jour. Anat. and Physiol., 1881)* teint d'abord au picro-carmin; il lave à l'eau acidulée par l'acide acétique. Il colore ensuite par le vert d'iode; il prend soin de ne pas produire de surcoloration; il lave à l'eau, déshydrate, passe dans l'essence de clou de girofle et monte dans le baume.

D'autres auteurs ont employé avec le picro-carmin le vert d'aniline, la roséine, le violet d'aniline, la nigrosine (1), par des méthodes analogues à celles de Stirling ou à celles que nous avons décrites plus haut.

Nous avons déjà dit que Lang avait réussi dans l'usage de l'éosine et le picro-carmin sur les planaires.

Le picro-carmin et l'hématoxyline donnent également des doubles teintes; on commence par colorer par le picro-carmin, puis on fait usage de l'hématoxyline.

(1) La nigrosine a été introduite dans les laboratoires de recherches par M. Léo Errera, le savant professeur de botanique à l'Université de Bruxelles.

III

RÉACTIFS DIVERS.

EAU.

Les solutions des réactifs solides doivent être faites avec l'eau distillée: l'eau ordinaire contient des sels qui produiraient des précipitations. Les dilutions d'alcool sont aussi opérées avec l'eau distillée: en se servant d'eau ordinaire, on obtient des liquides troubles.

Pour examiner les tissus frais et pour les préparations extemporanées, l'eau, exerçant une action destructive sur les tissus, ne peut être employée. Il est évident, toutefois, que les animaux qui vivent dans les eaux naturelles seront observés dans ces liquides.

Pour l'étude des infusoires et des vers parasites dans le tube digestif d'animaux, on se sert de l'eau salée contenant de 0,75 à 1 p. c. de chlorure de sodium. Les embryons d'oiseaux et de mammifères, pour les examiner vivants, sont placés dans l'eau salée tenue à 37-38° de température.

SÉRUM ARTIFICIEL DE KRONECKER.

Eau distillée,	1000 gr.
Soude caustique,	0,gr60.
Sel marin,	6 gr.

Ce liquide donne d'excellents résultats; il est recommandé pour les petits objets, les œufs, les infusoires, les embryons, etc.; Éd. Van Beneden (1) en a fait usage dans

(1) *Archives de Biologie*, t. IV, 1883.

l'étude de la segmentation des œufs de l'*Ascaris megalocephala*. Le sérum de Kronecker remplace avec avantage l'eau salée.

SÉRUM IODÉ DE MAX SCHULTZE.

On recueille l'eau de l'amnios d'un mammifère, du mouton, par exemple, ce qui peut s'obtenir facilement dans les abattoirs ; on ajoute au fond du flacon où on le conserve, quelques paillettes d'iode ; on agite souvent. Max Schultze remplace le liquide précédent par le *sérum iodé artificiel* qu'il prépare comme suit :

Blanc d'œuf,	30 gr.	(à peu près le contenu d'un œuf).
Eau,	200 gr.	
Chlorure de sodium,	40 centigrammes.	

Le liquide étant clarifié et filtré, on ajoute 6 gouttes de teinture d'iode pour 30 gr. de liquide.

Frey propose une formule analogue :

Eau distillée,	135 gr.
Albumine,	15 gr.
Chlorure de sodium,	$0,^{gr}20$.

Mélangez, filtrez et ajoutez 3 gr. de teinture d'iode ; on filtre de nouveau et l'on met au fond du flacon quelques paillettes d'iode.

GOMME ARABIQUE ET GLYCÉRINE.

(Liquide de Farrant.)

Gomme arabique,	100 gr.
Eau,	100 gr.
Glycérine,	2 gr.

Ce réactif est placé dans un flacon bouché; on y introduit un petit morceau de camphre.

LIQUIDE DE PACINI.

Premier mélange.

Sublimé,	1 partie	Eau distillée,	113 parties.
Chlorure de sodium,	2 »		
Glycérine,	13 »		

Après un repos de deux mois, on prend pour l'usage 1 partie de ce mélange et on ajoute 3 parties d'eau distillée. On filtre. Les nerfs, les ganglions, la rétine, etc., y sont conservés d'après l'auteur.

Deuxième mélange.

Chlorure mercurique,	1 partie	Glycérine,	43 parties.
Acide acétique,	2 »	Eau distillée,	215 »

Mélange employé comme le précédent.

D'autres liquides ont été proposés par Pacini. Ils contiennent tous 1 partie de mercure pour 1 ou 2 parties de sel marin et 100 ou 200 d'eau.

LIQUIDE DE GOADBY.

(The conserving liquor des Anglais.)

Sel de cuisine,	120 gr.
Alun,	60 gr.
Sublimé,	20 centigrammes.
Eau bouillante,	2 litres 1/2.

Ce liquide sert à la conservation des animaux marins. Il assombrit les objets microscopiques.

RÉACTIF POUR ÉCLAIRCIR ET MONTER LES PRÉPARATIONS.

Nous réunirons sous ce titre les réactifs à indice de réfraction élevé, employés pour éclaircir et conserver les préparations. Tels sont la glycérine, l'essence de clou de girofle, la térébenthine, l'essence de girofle, le baume de Canada, la résine de Dammar, etc. Pour faire comprendre le rôle des réactifs éclaircissants, Ranvier choisit un exemple très ingénieux : à travers une lame de verre, la lumière passe facilement, il y a transparence ; mais cette même lame, amenée à l'état de division, devient opaque; en effet, à travers la poudre de verre, la lumière ne passe pas, parce que les rayons lumineux, traversant un petit fragment de verre et un petit espace rempli d'air, y sont réfractés en tous sens suivant des angles variés. Que l'on verse sur ce verre pilé du baume de Canada, et aussitôt la masse s'éclaircira et elle deviendra de nouveau transparente. L'indice de réfraction du verre et du baume étant sensiblement le même, les réfractions causées par la présence de l'air entre les particules de verre n'auront plus lieu. Les rayons lumineux traverseront le tout comme si c'était une masse unique de verre. C'est dans un but analogue que l'on fait pénétrer des liquides, tels que la glycérine, l'essence de girofle, le baume de Canada, etc., à travers les tissus. On obtient ainsi un tout dont l'indice de réfraction est le même que le corps imprégnant.

Glycérine. — L'indice de réfraction de cette substance est

1,47 à l'état pur; mélangée à un égal volume d'eau, cet indice est 1,4. Par son indice élevé, elle rend transparents et éclaircit les objets; quelquefois même, surtout avec les objets délicats, la transparence devient si grande qu'il n'est plus possible de distinguer les éléments. Aussi, les pièces très opaques, durcies à l'alcool ou par l'acide chromique, ne tardent pas à devenir transparentes par leur immersion dans la glycérine.

On rencontre encore des personnes qui s'imaginent qu'il suffit de placer une coupe ou une pièce quelconque dans la glycérine pour obtenir une préparation; c'est là une grave erreur. Le réactif qui nous occupe est très avide d'eau qu'il enlève aux pièces qu'on y plonge en produisant des déformations, des gonflements, des ratatinements, etc. *Tout objet microscopique sera fixé avec soin avant d'être monté dans la glycérine.*

La glycérine, à cause de cette action altérante, sera rarement employée pure; on l'étendra d'eau soit en ajoutant 1 volume d'eau à 2 volumes de glycérine, soit encore en plaçant sur la lame une goutte de glycérine et une goutte d'eau que l'on mélange ensuite avec une aiguille.

Il est souvent avantageux de faire usage de glycérine étendue d'eau comme on vient de le voir et d'y ajouter $^1/_{100}$ d'acide acétique ou formique; c'est ce dernier liquide qui est préférable. C'est dans la glycérine ainsi acidulée que seront montées les pièces colorées par les liquides carminés. Pour le picro-carmin, il est pratique d'ajouter à la glycérine quelques gouttes de ce liquide colorant; sinon, la glycérine se charge de la couleur en l'enlevant aux tissus.

Dans le laboratoire, on aura ainsi : 1° *de la glycérine*

étendue d'eau; 2° *de la glycérine acidulée par l'acide formique* (glycérine formique); 3° *de la glycérine acidulée et, en outre, légèrement colorée par le picro-carmin.*

Dans certains cas, si l'on veut augmenter l'indice de réfraction de la glycérine, on dissout du chlorure de cadmium ($n = 1{,}504$) (Abbe. JMS, 1879, p. 346). Une solution saturée de chloral hydraté dans la glycérine a un indice égal à 1,51.

La *glycérine-chloral* a été recommandée par Basset et Abbe pour liquide d'immersion. Peut-être donnerait-elle des résultats comme liquide pour monter les préparations. La visibilité d'un objet microscopique est proportionnelle à la différence entre l'indice de réfraction de cet objet et celui du milieu dans lequel il est monté. Pour l'étude des fines structures, il y a donc avantage à augmenter l'indice de réfraction, de façon à atteindre un indice plus grand que celui de la glycérine et du baume.

Les préparations à la glycérine seront fermées avec soin, sinon cette dernière absorbe l'humidité de l'air.

On aura soin de s'assurer, à l'aide du papier de tournesol, si la glycérine du commerce n'est pas acide.

Glycérine-gélatine. — Pour éviter le déplacement des objets dans la préparation et les mouvements des lamelles, comme aussi pour rendre moins transparents les objets, on a proposé plusieurs formules de mélanges de glycérine et de gélatine. Il suffit de faire connaître ici une seule formule, celle qui donne les meilleures préparations. Elle a été proposée par Kaiser, non-seulement pour monter les préparations, mais encore comme masse d'inclusion.

Voici comment on obtient la glycérine-gélatine de Kaiser:

on dissout une partie de gélatine ordinaire dans sept parties d'eau, on chauffe jusqu'à dissolution, on ajoute six parties de glycérine, puis $^1/_2$ p. c. d'acide phénique. Si l'on possède un entonnoir pour filtrer à chaud, on soumet le liquide à la filtration. Par le refroidissement, on obtient une masse solide transparente quand elle est en mince couche.

Pour monter les préparations, on chauffe uniformément au bain-marie une lame au milieu de laquelle on a placé une quantité suffisante de gélatine glycérine; quand cette dernière est devenue liquide, on dispose convenablement l'objet que l'on a fait séjourner dans l'eau de façon à le débarrasser et d'acide et d'alcool. On ajoute encore un petit fragment de gélatine pour recouvrir le spécimen, puis on fixe la lamelle qui doit être également recouverte d'une légère couche de gélatine que l'on tient également liquide en chauffant doucement. Par le refroidissement, la lamelle est fixée suffisamment à la lame pour qu'il n'y ait pas besoin de luter; il est pourtant préférable de recourir à cette opération, suivant les règles que nous indiquerons plus loin.

Baume de Canada. — Le baume de Canada, tel qu'il est fourni dans le commerce, s'emploie à chaud; on dissout dans la térébenthine, la benzine, le chloroforme ou le xylol. Pour les coupes et souvent pour les objets délicats qui ne peuvent être chauffés, c'est au baume dissout que l'on aura recours. A peu d'exceptions près, le baume est placé sur la lamelle et convenablement étendu; cette dernière est placée avec une petite pince sur l'objet à recouvrir.

Cependant, il arrive que l'on doive faire pénétrer le baume dissout et liquide par capillarité sous la lamelle en enlevant par du papier buvard l'essence de girofle qui a éclairci l'objet.

Le baume doit être amené par dilution à une faible consistance, de façon que cette opération soit possible. Il est utile d'avoir à sa disposition du baume sous trois formes : 1° *tel qu'on le livre dans le commerce; 2° dilué dans la térébenthine à une moyenne concentration; 3° dilué de façon qu'il soit presque liquide afin de pouvoir couler facilement.* Dans ces deux derniers cas, on sèche le baume en évaporant à une température de 40 à 60° dans une étuve.

Tout objet qui sera monté dans le baume devra, au préalable, être: 1° déshydraté par l'alcool absolu; 2° clarifié par l'essence de girofle. Après éclaircissement, on fixe la lamelle enduite de baume.

On pourrait quelquefois se dispenser de passer à l'essence de girofle; mais ce corps est un meilleur dissolvant du baume que l'alcool absolu. La préparation réussit mieux ainsi. A la rigueur, on peut passer de l'alcool à 90° à l'essence de girofle qu'il faut alors renouveler au moins deux fois, puis on monte dans le baume. Cela s'explique : l'alcool à 90° dissout l'essence de girofle; celle-ci, à son tour, dissout le baume.

En montant directement dans le baume un objet venant de l'alcool non anhydre, on court le risque de voir des nuages de précipités résineux se former dans les préparations.

Les spécimens montés au baume non dissout peuvent être maniés sans être lutés; quand le baume a été employé liquide, il sèche lentement; l'emploi de la chaleur est ce qu'il y a de mieux pour obtenir la fixation définitive de la lamelle.

Avec le baume liquide, on n'a pas à s'inquiéter des bulles d'air qui se seraient introduites dans les préparations; elles

finissent par disparaître après quelques jours. Avec le baume non dissout, il faut avoir soin qu'il ne reste pas de bulles d'air, car, s'il est impossible de les enlever plus tard. Il est d'usage de ne pas luter les préparations montées au baume ; une fois sèches, il vaut cependant mieux les fermer.

La résine de Dammar dissoute dans la benzine ou dans la térébenthine a été employée pour remplacer le baume.

D'après Vogt et Jung *(Traité d'anatomie pratique,* page 31), les meilleurs résultats sont obtenus en mélangeant le baume et la résine de Dammar en parties égales. Pour obtenir ce mélange, il faudra agir sur du baume et de la résine de Dammar dissouts dans la térébenthine ou la benzine.

Duval *(Précis de Technique microscopique)* estime que le baume de Canada et la résine de Dammar ont les mêmes qualités et qu'il n'y a pas de raison pour préférer l'une des substances à l'autre.

Flemming *(Arch. f. Mik. Anat. 1881)* dissout la résine de Dammar dans parties égales de benzine et de térébenthine; il évapore ainsi jusqu'à consistance d'un épais sirop. Cette résine n'est pas entièrement soluble dans l'éther, ni dans la benzine, ni dans la térébenthine à la température ordinaire; en employant la chaleur, la solution se fait mieux; mais par le refroidissement, la masse devient laiteuse et il est impossible de clarifier.

Dans la *Science Gossip, 1882,* on trouve le procédé suivant pour éviter ces inconvénients : à 4 parties de Dammar, on ajoute 8 parties de benzine; celle-ci dissout la résine à la température ordinaire. Après un jour ou deux, le résidu insoluble est déposé. On décante avec soin le liquide clair

surnageant, puis on ajoute une partie d'essence de térébenthine.

Le STYRAX et le LIQUIDAMBAR ont été préconisés par Van Heurck *(Bulletin de la Soc. Belge de Micros. 1884, p. 154)* pour monter les préparations. Ces deux corps peuvent être employés également pour conserver les tissus histologiques. Le styrax se vend à Dresde chez MM. Gehe et Cie. Il contient des impuretés dont on le débarrasse en le dissolvant dans le chloroforme et en le filtrant. Dans le laboratoire, le baume de Canada suffit.

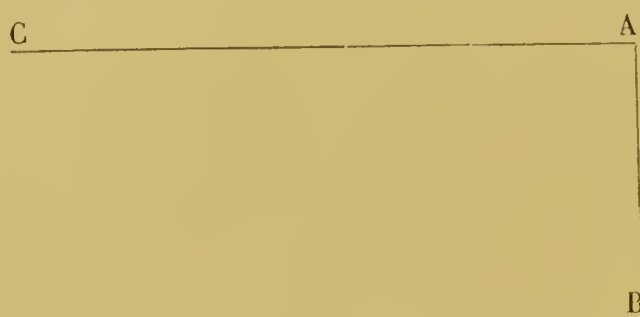
IV

FERMETURE DES PRÉPARATIONS.

Nous avons déjà dit que les préparations montées au baume restaient le plus souvent sans être fermées. Il vaut mieux, cependant, les luter quand le baume est bien sec, ce qui n'arrive le plus souvent qu'après un temps assez long. Pour ce genre de préparations, le baume très dur et ramolli par la chaleur sert fort bien au lutage. Il suffit de chauffer convenablement un flacon de baume au bain-marie et d'en étendre sur le bord de la lamelle avec un pinceau.

Les préparations à la glycérine doivent être fermées. Voici, à notre avis, le mode de lutage le plus simple, le plus rapide et le plus sûr : on courbe à angle droit un fil de fer de deux millimètres de diamètre, comme l'indique la figure ci-jointe; on chauffe la branche AB à la flamme d'une lampe à alcool; on la plonge bien chaude dans un fragment de paraffine; une petite quantité de cette substance liquide

reste adhérente au fil de fer que l'on applique le long des bords de la lamelle de façon qu'une petite surface de la



lame soit aussi recouverte. On ferme ainsi parfaitement la préparation. On applique ensuite sur la paraffine, à l'aide d'un pinceau, une couche de cire à cacheter rouge ou noire dissoute dans l'alcool. Pour obtenir cette solution, on broie dans un mortier de la cire à cacheter de bonne qualité; on ajoute de l'alcool afin d'obtenir une solution sirupeuse. Ordinairement et surtout avec la cire rouge, il surnage un liquide brunâtre que l'on sépare et que l'on rejette.

Pour que la fermeture s'exécute bien, il est nécessaire, à l'endroit où la paraffine doit adhérer, d'enlever avec le plus grand soin la glycérine qui proviendrait de la préparation; il suffit pour cela de frotter la lame légèrement avec un linge mouillé d'eau le long du bord de la lamelle, sans cependant toucher celle-ci. Si la lamelle avait été humectée de glycérine, on commencerait par la fixer avec soin aux quatre angles par un peu de paraffine avec le fil chauffé; on essuierait ensuite avec un linge mouillé. Ce mode de fermeture réussit très bien; nous le recommandons aux commençants. La cire à cacheter est durcie après quelques minutes.

Le bitume de Judée, en solution dans la benzine ou la térébenthine, est un bon lut. Pour éviter l'écaillement, Ran-

vier conseille de le dissoudre au bain-marie dans les liquides ci-dessus indiqués et de prolonger longtemps l'action de la chaleur.

Le *ciment au blanc de zinc* est connu depuis longtemps sous le nom de ciment de Ziegler. Le Dr James, dans le *Journal of de Royal Micr. Soc.*, 1885, p. 1101 *(Extr. du Saint-Louis national Druggist*, 1885), donne le moyen suivant pour le préparer :

a) Il dissout la résine de Dammar dans la benzine de façon à obtenir un sirop peu épais.

b) Dans une petite capsule en porcelaine, il verse une petite quantité de blanc de zinc (oxyde de zinc chimiquement pur) parfaitement desséché (il le chauffe donc au préalable pour chasser toute humidité) ; il ajoute une petite quantité de benzine, puis il verse sur le tout la solution de Dammar obtenue en *a* jusqu'à consistance de la crème ou d'une couleur épaisse. Il agite de façon qu'il ne se forme pas de grumeaux. Il suffit maintenant de décanter après avoir secoué vivement et laissé reposer les grosses particules qui se déposent dans le flacon où l'on verse la préparation. Stieda a fait aussi connaître une recette pour le *ciment à l'oxyde de zinc* : dans de la térébenthine, il ajoute du blanc de zinc, puis une solution de Dammar dans la térébenthine jusqu'à consistance sirupeuse.

Dans le *Journal of the R. Micr. Soc.*, 1882, on trouve une formule d'un lut qui consiste à mêler du blanc de zinc employé en peinture avec du baume dissout dans le chloroforme. On ajoute un peu de térébenthine. La mixture doit avoir l'aspect de la crème.

On peut se procurer dans le commerce le ciment au blanc

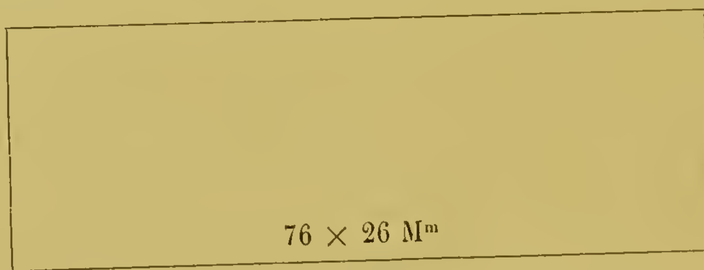
de zinc. Il en est ainsi du gold-size, du Brunswick-black, de la glue-marine des Anglais et du maskenlack des Allemands, etc. Quelques-unes de ces préparations sont inconnues; les autres s'obtiennent à si bon compte que ce serait perdre son temps que de les préparer soi-même.

Le gutta-percha, dissout dans la térébenthine, a été préconisé par Harting pour le lutage des préparations. Cet auteur dissout en chauffant, dans 15 parties de térébenthine, 1 partie de gutta-percha. Les matières insolubles sont séparées par décantation. Il ajoute 1 partie de gomme laque.

Pour se servir de ce lut, il faut chauffer chaque fois. On peut dissoudre également le caoutchouc dans la benzine et y ajouter de la craie sèche et en poudre pour en former une pâte de la consistance de la crème. Pour colorer, on additionne d'un peu d'ocre bien sèche.

Le débutant s'en tiendra au premier mode de fermeture indiqué en se servant de la paraffine et de la cire à cacheter.

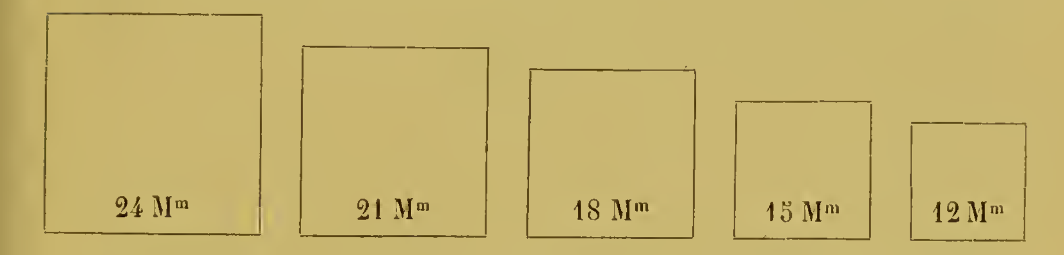
Lames. — Les lames de verre que l'on emploie sont rectangulaires et ont 26 m/m de large sur 76 de long.



C'est le format anglais le plus usité et aussi le plus recommandable. On se les procure dans le commerce, qui les livre rodées ou non rodées; celles-ci sont beaucoup moins coûteuses et sont tout aussi bonnes.

Lamelles. — Les lamelles (couvre-objet, cover, deck glass, etc.) sont en verre très mince; l'épaisseur la plus convenable est de 12 à 20 *microns*.

Plus épaisses, elles ne conviennent que pour des préparations qui ne donnent pas lieu à l'étude des fines structures. Voici les dimensions les plus employées :



Le format le plus convenable est le 18 sur 18. C'est celui-là que choisira le commençant.

Les lamelles rondes servent surtout quand il s'agit de préparations de collections qui doivent plaire avant tout par la forme extérieure. Dans la pratique, elles présentent des inconvénients; il est difficile de faire pénétrer un liquide par l'intermédiaire du papier buvard; on les ferme aussi plus difficilement.

Un appareil est nécessaire pour cette opération. Il est composé d'une platine circulaire tournant sur un pivot fixé dans une pièce de bois; la platine porte deux valets pour fixer les préparations; au centre se trouvent des cercles concentriques, qui doivent servir de guides à l'opérateur pour chaque dimension de verre qu'il emploie. Cet appareil porte le nom de tournette. Il importe d'ajouter qu'il est complètement inutile. On voit souvent des personnes posséder de très belles tournettes et manquer d'instruments bien plus

utiles. Dans les recherches scientifiques, dans les laboratoires, c'est toujours le format carré ou rectangulaire pour les lamelles qui est en usage. L'emploi des lamelles rondes est très restreint.

Les marchands de préparations, qui doivent souvent donner plus de valeur à l'aspect extérieur de leur produit que de véritables qualités au point de vue scientifique, font usage de verres ronds et bien lutés.

V

USTENSILES NÉCESSAIRES AUX COMMENÇANTS.

Pour la préparation des diverses solutions en usage dans la technique, des instruments de mesure sont nécessaires. Une petite balance (à la rigueur, un pèse-lettre) est indispensable; les pesées devront être possibles à 5 centigrammes près.

Quelquefois, il faut que l'on puisse atteindre le centigramme; dans ce cas, il suffirait de faire la pesée chez un pharmacien.

Les liquides se mesureront avec une éprouvette graduée; il suffit qu'elle contienne 100 c/c et qu'elle soit divisée en centièmes. Une burette graduée, divisée en 100 c/c, trouvera souvent son application.

Un entonnoir en verre de 10 centimètres de diamètre est nécessaire.

Une ou deux capsules (en porcelaine de Bayeux) d'un diamètre de 10 centimètres serviront dans un grand nombre de circonstances.

On acquerra également une série de verres de montre ; on en choisira quelques-uns ayant 7 à 10 centimètres de diamètre.

Il est souvent nécessaire de faire agir un liquide pendant un certain temps sans laisser se produire d'évaporation : on se sert alors de la CHAMBRE HUMIDE. Celle-ci n'est autre chose qu'une petite cloche renversée sur une assiette dans laquelle on place de l'eau ou de l'alcool qui doit saturer de vapeurs l'espace compris sous la cloche.

Les préparations sont alors placées dans cette chambre humide sur une petite étagère construite avec des bâtons de verre disposés en échelle et attachés à des distances égales le long de quatre montants en bois ou en métal. On peut se construire soi-même ce petit appareil. On coupe quatre fragments égaux d'une règle à ligner; on y perce, sur des faces contiguës et à des distances égales, les trous nécessaires pour y introduire de petits bâtons de verre de même longueur.

En disposant ces derniers convenablement, on obtient une petite cage dont chaque face simule une échelle. Les échelons sont les baguettes de verre.

Pour contenir les différents alcools, on fabriquera des pissettes, comme on le fait dans les laboratoires de chimie. Des récipients de ce genre, mais bouchés à l'émeri, se trouvent dans le commerce. La contenance d'un demi-litre suffit.

Les principaux réactifs colorants, la glycérine, l'essence de girofle, etc., seront conservés dans des flacons compte-gouttes fermés à l'émeri (spécialité de la maison Leybolt de Cologne).

Quelques ballons en verre (250, 500 et 1,000 c/c) et quelques tubes d'essai seront souvent très utiles.

Quand on n'a pas le gaz à sa disposition, on se servira d'une lampe à pétrole à *mèche ronde,* dont le récipient sera rempli *d'alcool*. Il est évident que cette lampe doit fonctionner sans cheminée de verre. On modérera la température à volonté.

Nous trouvons ce système meilleur que la lampe à alcool traditionnelle.

Comme bain-marie, on emploiera un récipient quelconque sur lequel s'appliqueront les capsules dont on se sert.

Les supports seront confectionnés avec du fil de fer un peu gros qu'on reliera par du fil plus mince.

Bien d'autres instruments trouveraient application dans l'installation du commençant; il en sentira lui-même la nécessité à mesure qu'il progressera. Nous avons voulu renseigner ce qui est absolument indispensable dès les débuts.

VI

MÉTHODES EMPLOYÉES DANS LES RECHERCHES D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Chaque fois que la chose est possible, après un examen à l'œil nu et à la loupe montée, on étudiera sous le microscope les organismes ou parties d'organisme sans leur faire subir de modification. Il faudra donc n'employer que des liquides qui n'altèrent pas, ou tout au moins qui ne modifient que faiblement les objets.

Prenons quelques exemples : 1° Supposons qu'on veuille

étudier le cyclope, ce petit crustacé si commun dans les mares. On le saisira avec la pipette-entonnoir (fig. 4).

On examinera le petit animal dans l'eau même où il vit. On le placera à cet effet sur une lame, puis on le recouvrira d'une lamelle. Pour éviter l'écrasement, on maintiendra cette dernière par un fragment de cheveu. On examinera au microscope.

S'il s'agit d'infusoires ou de vers vivant dans un tube digestif, on les immergera dans l'eau salée à $^1/_{100}$.

Pour l'examen d'un embryon d'oiseau ou de mammifère, alors qu'on désire les étudier vivants, on emploie le sérum artificiel de Kronecker, que l'on maintient à la température d'incubation.

Les animaux vivant dans les humeurs seront examinés dans les liquides où on les trouve. Ainsi, la grégarine du verre de terre sera immergée dans le suc périviscéral de son hôte.

En résumé, l'examen d'un organisme vivant se pratique en le plaçant dans des conditions d'existence aussi semblables que possible de celles où il vit ordinairement.

2° Un organisme tué ou un fragment d'un être organisé séparé du sujet sera d'abord étudié dans des liquides indifférents, tels que l'eau salée, le sérum artificiel, les sérums iodés, quelquefois même dans la salive.

Dès les premiers essais dans les conditions qui précèdent, il sera indispensable de dessiner ce que les préparations montrent au microscope. On s'aidera de la chambre claire. On tiendra note de toutes les observations.

Le premier examen terminé, on prendra un certain nombre de sujets convenablement choisis pour les fixer par

des réactifs appropriés. Si l'on ne disposait que d'un seul être que l'on devrait étudier, on aura soin, dans l'examen préalable, de prendre les précautions nécessaires pour ne point en altérer la structure.

La fixation achevée, on fera usage des quatre méthodes que nous allons sommairement décrire, soit en les employant simultanément, soit en ne se servant que d'une seule, suivant les circonstances.

Continuons à nous servir d'un exemple, et supposons que l'on veuille étudier ce petit crustacé, le cyclope, dont nous avons déjà parlé.

Après l'étude préalable à l'état frais, *on le fixera* par le liquide de Kleinenberg; on le passera aux différents alcools, puis on le colorera (cochenille alcoolique de Mayer). On fera agir l'alcool à 90°, puis à 100°; on éclaircira par l'essence de girofle; on montera dans le baume. On agira de même chaque fois que l'objet sera assez petit et qu'il y aura possibilité de l'amener à une transparence suffisante. Donc, la deuxième méthode à employer, quand cela pourra se réaliser, est de préparer l'individu entier en le fixant, le colorant et le montrant comme nous venons de l'indiquer. Avec un fragment d'organe quelconque, on n'agirait pas autrement.

Mais le cyclope dont nous venons de parler contient des organes; par exemple, il porte quelquefois des ovisacs contenant des œufs, il contient des muscles, etc. Il importe de connaître chacune de ces choses.

Sous le microscope simple ou sous la loupe, on disséquera, avec des aiguilles et dans un liquide convenable, le petit être, en vue d'étudier les œufs des ovisacs, les muscles, etc.

On fixera encore ces parties par des réactifs; on les colorera, puis on les montera dans le baume ou la glycérine. Cette méthode n'est autre chose que *la dissociation*. Des liquides spéciaux, l'alcool $^1/_3$, l'acide chromique à $^1/_{1000}$, qui, tout en fixant, permettent de détruire la cohérence entre les organes ou les cellules, conviennent bien pour cet usage. Souvent, les dissociations portent sur les cellules mêmes.

Mais les trois méthodes qui précèdent, dans bien des circonstances, ne suffiront pas pour nous révéler la structure des êtres vivants. Avec ces moyens, il ne nous sera pas possible de connaître quels sont les rapports exacts des différents organes qui composent le *cyclope*. Il faut maintenant avoir recours à la méthode des coupes. On sectionnera l'animal en un certain nombre de tranches minces transversales et longitudinales, en lui faisant subir des opérations qui seront décrites plus avant.

Voilà, en résumé, les moyens qui nous permettent d'arriver à la connaissance et de la structure et de la texture des êtres vivants. Nous allons nous occuper en détail de ces méthodes.

PREMIÈRE MÉTHODE.

EXAMEN DES OBJETS VIVANTS.

Comme nous l'avons dit plus haut, la première condition pour réussir dans l'étude d'un être vivant, c'est de l'examiner dans les conditions où il vit. On l'immergera dans les liquides naturels où il se trouve habituellement, ou bien dans des liquides artificiels qui ne lui feront subir aucune

altération chimique. Souvent, il faut prendre des précautions pour éviter l'évaporation de ces liquides, même si l'on examine sous une lamelle. On borde alors la préparation le long de la lamelle avec de la paraffine, en laissant quelques points ouverts pour permettre l'oxygénation, ou bien on se sert de la chambre humide de Ranvier. Cette chambre de Ranvier n'est autre chose qu'un couvre-objet dans lequel, au

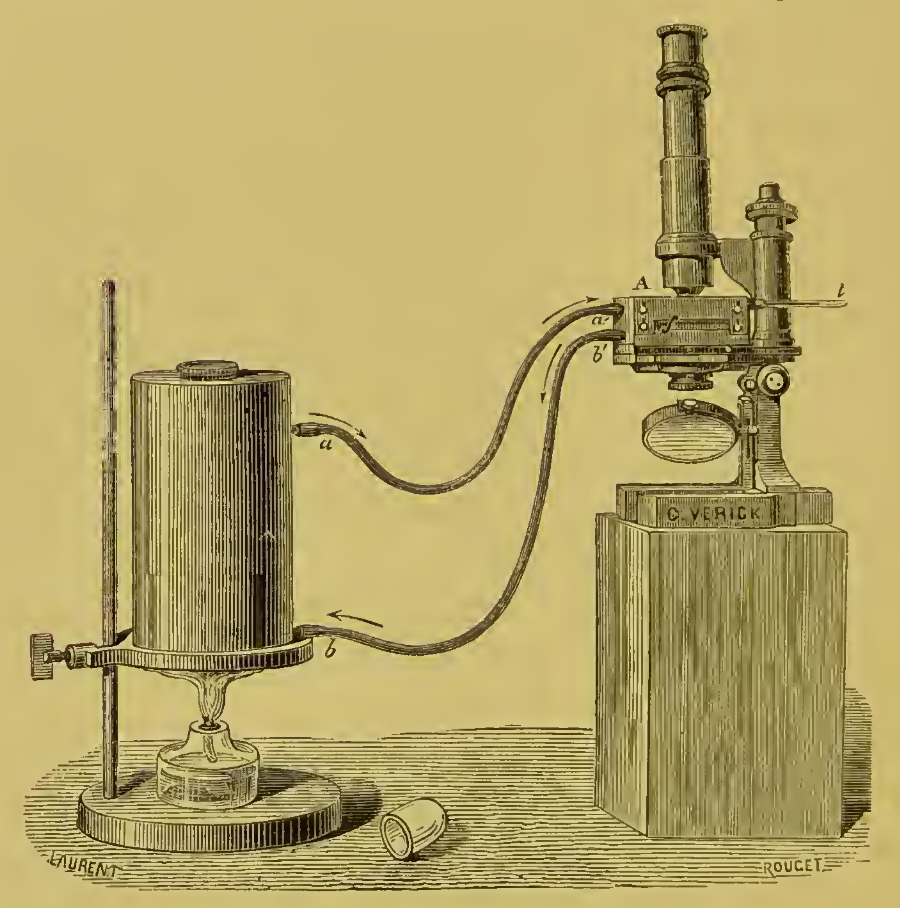


Fig. 84*bis*.

milieu, on a creusé circulairement une rigole. Cet accessoire se trouve dans le commerce; il peut également servir de chambre à culture. (Porte-objet à rigole.)

La chambre humide de Reeklinghausen sert aussi à l'usage que nous venons d'indiquer. C'est une lame de verre au milieu de laquelle est fixé un anneau de même substanee; un tube en caoutchoue à paroi minee et très élastique s'y attache par l'une des extrémités; l'autre extrémité se fixe par un petit cordon de caoutchoue au front de l'objectif. Les animaux ou autres objets sont placés dans l'anneau de verre avee le liquide qui leur eonvient; l'espaee se sature d'humidité et l'évaporation n'est pas possible.

Platine chauffante. — Dans l'examen des embryons vivants de mammifères et d'oiseaux, des leueocytes, etc., il faut élever la température par des appareils appelés *platine chauffante*. Les construeteurs en fournissent de différents modèles, qui présentent tous des avantages et des ineonvénients.

La nouvelle platine chauffante de Stricker, eonstruite par Reichert, est très recommandable; elle coûte 44 fr. Nous allons décrire la platine ehauffante de Ranvier, qui est devenue classique (fig. 84*bis*) (1).

Elle se compose d'une boîte rectangulaire en laiton A; à la partie moyenne est ménagée une fente *f*; e'est par là que l'on glisse la préparation. Correspondant au trou de la platine, inférieurement et supérieurement au tube du mieroscope, se trouve une cavité cylindrique qui laisse passer la lumière et qui permet d'amener l'objectif jusqu'à la préparation. Sur le côté, on a appliqué un ereux en forme de dé pour y placer le thermomètre *t*. Deux tubulures *a'* et *b'*, auxquelles on adapte des tubes en caouteh oue, mettent la

(1) La platine chauffante de Ranvier est construite par Verick, rue de la Parcheminerie, à Paris.

platine en communication avec la marmite; celle-ci porte également deux tubulures *a* et *b* où sont reliés les tubes en caoutchouc.

La marmite est complètement remplie d'eau; on chauffe avec une lampe à alcool. La circulation de l'eau a lieu dans le sens des flèches. Mais pour qu'elle s'accomplisse convenablement, il est nécessaire que la marmite soit moins élevée que la platine chauffante. Quand la température est arrivée à 39-40°, pendant un quart d'heure, il n'est plus nécessaire de chauffer.

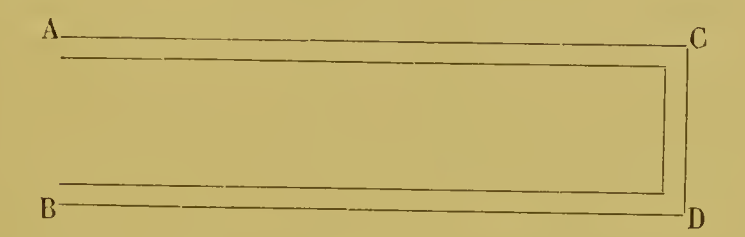
Le débutant pourra faire construire chez un fabricant d'objets en cuivre une platine chauffante très simple et qui lui rendra tous les services d'un appareil plus cher. Sur les dimensions de la platine de son microscope, il fera construire une boîte rectangulaire en laiton et ayant au centre une ouverture égale à celle de la platine microscopique; la hauteur sera d'un centimètre et demi. Latéralement, il fera souder deux petits tubes d'un demi centimètre de diamètre, pour y attacher un tube de caoutchouc. Il faut que les faces supérieure et inférieure soient bien planes. La seule difficulté à vaincre, c'est de disposer convenablement l'ouverture centrale; il suffit pour cela de percer une ouverture circulaire dans la face supérieure et inférieure exactement en regard, et d'unir les deux faces par un tube que l'on soude au bord des ouvertures. On ménage une fossette en forme de dé pour placer un petit thermomètre dans la face supérieure.

Pour se servir de cet appareil, on porte à la température convenable un ballon contenant de l'eau; on y introduit un tube en caoutchouc que l'on adapte à l'un des tubes latéraux

de la boîte, de façon à produire un siphon; l'autre tube est muni également d'un tube en caoutchouc qui amène l'eau dans un vase. On modère l'arrivée de l'eau dans ce système en pinçant le tube en caoutchouc en rapport avec le ballon.

Enfin, on se servirait encore d'une disposition plus simple et moins coûteuse, mais non applicable dans tous les cas; voici comment :

On recourbe un tube de verre de $^1/_2$ à $^3/_4$ de centimètre de diamètre à deux angles droits, suivant le diagramme



ci-dessus; les deux branches AC et BD doivent se trouver exactement dans le même plan; la distance entre AB et DC doit être de 20 millimètres. Il faut que la longueur des branches soit telle que l'appareil étant disposé latéralement sur la platine, elles dépassent vers A et B de deux centimètres, tandis que CD corresponde au bord de la platine. En A, on attache un tube en caoutchouc plongeant dans un ballon où l'on chauffe de l'eau à une température convenable. En B, on attache un autre tube servant à l'écoulement de l'eau, que l'on recueille dans un petit baquet. Les choses sont disposées de telle sorte que le tube, arrivant en A, joue le rôle de siphon. Le tube ABCD est fixé avec soin sur la platine du microscope par les valets. La préparation est placée sur l'appareil ainsi disposé. On règle l'arrivée de l'eau en A par l'intermédiaire d'une pince à burette ou par tout

autre moyen. La température dans le ballon doit être plus élevée de 5 à 6 degrés que celle de la préparation.

Les objets que l'on examine, les vers par exemple, doivent être quelquefois graduellement comprimés pour que l'on puisse les examiner. On trouve dans le commerce divers compresseurs plus ou moins ingénieux et qui servent à cet usage. Quand on ne possède pas un tel appareil, on se sert d'une grande lamelle que l'on charge graduellement de petits poids. On arriverait encore à de bons résultats en entourant la lamelle et la lame de quelques tours de fil fin que l'on serre graduellement. En introduisant un petit bâton dans les contours, on arriverait, en le tournant, à rapprocher les deux verres et à comprimer.

Certains organismes, des embryons de poulet, par exemple, de 35 heures à 4 jours, qui ont des aires vasculaires développées et dans lesquelles on voudra étudier la circulation, seront attachés au fond de petits baquets de verre dans lesquels on coulera de la cire d'abeille. On ferait adhérer celle-ci au verre par une mince couche de cire à cacheter. On ne laissera de la cire qu'à la périphérie; au centre, elle sera enlevée; on obtiendra ainsi au fond du vase une couronne circulaire de cire sur laquelle les membranes seront attachées par des aiguilles. Comme récipient, on emploie dans ce cas des verres de montre à fond plat. Là où le fond est aplati, on ne laisse pas de cire. La couche de celle-ci ne doit pas dépasser plus de 1 $^1/_2$ mm. en épaisseur.

Si, après avoir étudié vivant un être quelconque, on est obligé ensuite de le soumettre aux méthodes qui vont suivre, on ne saurait prendre trop de précautions pour qu'il ne se produise aucune altération, soit par les liquides, soit par

des compressions trop fortes. On ne comprimera jamais un animal qui devra être étudié ultérieurement par la méthode des coupes.

DEUXIÈME MÉTHODE.

PRÉPARATIONS D'ANIMAUX OU D'OBJETS ENTIERS.

Essentiellement, cette méthode comprend trois opérations : *1° la fixation des éléments histologiques dans leur structure et leur texture ; 2° la coloration ; 3° la conservation de l'objet en le montant dans un milieu qui le préserve d'une altération quelconque tout en le rendant suffisamment transparent.*

La fixation, la coloration et le montage se font par les réactifs que nous avons étudiés précédemment. Par les deux premières opérations, on fait subir aux tissus des modifications chimiques dans la plupart des cas ; il faut donc tenir compte de la composition des tissus sur lesquels on opère. Par le montage, on assure la conservation des tissus ; il faut, en outre, les rendre visibles au microscope. La théorie optique nous a appris qu'il était nécessaire, quand il s'agit de fines structures à étudier avec les homogènes, d'augmenter l'indice de réfraction du milieu dans lequel l'objet est immergé. Comme la visibilité est proportionnelle à la différence des indices de réfraction de l'objet et du milieu où il se trouve, on a donc intérêt à monter dans des substances à hauts indices de réfraction. Les observateurs feront bien de tenir compte de ces considérations, surtout quand il s'agit d'étudier des structures d'éléments très minimes. Ceci n'est pas applicable aux recherches courantes.

Chaque fois que l'on emploiera un réactif, on aura soin

de ne pas perdre de vue les propriétés qu'il possède. On s'évitera ainsi bien des déceptions.

Pour plus de facilité, nous subdiviserons la méthode qui nous occupe en un certain nombre de points qui comprendront presque toutes les difficultés qui pourront se présenter.

1° Préparations de très petits objets sur la lame et sous la lamelle. Exemples : infusoires, grégarines, globules sanguins, ovules de mammifères, etc.

Les objets étant très petits, on fera les opérations en se guidant avec le microscope simple. Les organismes que l'on étudie seront placés sur la lame dans le liquide où ils vivent. On recouvrira d'une mince lamelle que l'on soutiendra par un cheveu, afin d'éviter l'écrasement. A l'un des côtés de la lamelle, on déposera une goutte du liquide fixateur, tandis que de l'autre, on soutirera, par un fragment de papier buvard, le liquide primitif. On laissera réagir pendant le temps nécessaire. Puis on lavera à l'eau ou à l'alcool faible, suivant les circonstances. Le lavage se fera de la façon que nous venons d'indiquer; l'addition d'un nouveau liquide se pratiquera du côté où l'on aura enlevé par le papier buvard et cela pour éviter les déplacements trop considérables des petits objets que l'on prépare. Si ceux-ci venaient à rouler tous d'un même côté, de façon à faire craindre qu'ils glissent en dehors de la lamelle, on soutirerait par un fragment de papier-filtre pour les ramener vers le centre de la préparation. En se guidant à l'aide d'une loupe ou du microscope simple, on conduit facilement ces opérations.

La fixation et les lavages à l'alcool terminés, on produit la coloration. Si elle doit durer longtemps, les préparations

sont déposées sur l'étagère dans la chambre humide; si on ne possède pas cet appareil, il faudra border la préparation à l'aide de la paraffine. La teinte obtenue, on déshydrate par l'alcool à 90°, à 100°; on clarifie par l'essence de girofle et l'on monte dans le baume ou dans le Dammar. Pour conserver dans la glycérine, il suffit de passer à l'alcool à 90°, et ce dernier enlevé, d'ajouter une goutte de glycérine que l'on fait pénétrer par capillarité et par le papier buvard.

Ces dernières opérations, il est à peine besoin de le dire, ont lieu de la même façon que les premières : on enlève un liquide sous la lamelle en aspirant d'un côté avec du papier buvard, tandis que de l'autre côté on fait pénétrer le nouveau liquide. Quand on se sert du baume, il faut que ce dernier soit rendu fluide par la térébenthine ou le chloroforme; ces derniers liquides s'évaporant à la longue, on est obligé d'ajouter du baume de temps à autre. On n'a pas à s'inquiéter des bulles d'air qui resteraient sous la lamelle; elles disparaissent par cette méthode après quelques jours, si l'on emploie le baume liquide.

2° *Préparation sur le porte-objet sans recouvrir de la lamelle.* Les objets ayant un certain volume, placés sous une lamelle là où il y aurait contact avec cette dernière, l'action des liquides ne se ferait que difficilement et très lentement; aussi ne recouvre-t-on plus alors de la lamelle. La marche des opérations est la même. Après clarification par l'essence de girofle, on enduira convenablement une lamelle de baume demi liquide, et la tenant non pas avec les doigts, mais avec une petite pince, on recouvrira la préparation.

3° *Préparation dans des verres de montre.* Il y aura souvent avantage à réaliser les opérations qui précèdent (2°)

dans des verres de montre ou dans de petits baquets analogues. Cela se fera avec des objets de moyennes grandeurs, qui ne sont pas susceptibles de se contourner. On préparera ainsi des embryons de poulet depuis dix-huit heures jusque trente heures, des ovules de grenouille, etc. L'objet étant placé dans un récipient convenable, on y verse le réactif fixateur; quand celui-ci a agi, on lave à l'eau et à l'alcool faible; on passe dans les différents alcools; ensuite, on colore et on déshydrate comme à l'ordinaire. On clarifie, puis l'objet est placé sur une lame dans un peu de baume. On recouvre d'une lamelle enduite de baume demi fluide.

Les planaires et autres turbellariés, les trématodes, etc., quand ils sont bien étalés dans des verres de montre contenant le moins d'eau possible, seront traités en y versant une dissolution concentrée de chlorure mercurique bouillant. L'alcool bouillant est également bon. Quelquefois même, il sera nécessaire d'introduire, dans le baquet, une pipette contenant de l'acide osmique ou un autre réactif, en fermant l'ouverture supérieure avec le doigt, puis laissant écouler subitement le liquide fixateur sur l'animal étalé. L'hydre se fixe aussi très bien, les tentacules développés. Les lavages à l'alcool se feront dans les verres de montre; il en est de même de la coloration et de la clarification. Pour monter dans le baume, la pièce sera placée, au préalable, sur la lame recouverte d'un peu de baume. On recouvrira de la lamelle, comme il a été indiqué plus haut. De petits baquets à fond de cire d'abeille serviront à attacher et à étaler les membranes.

4° *Les objets à préparer sont membraneux; ils peuvent subir des retraits par la fixation.* On les fixera alors au fond des baquets, comme nous l'avons dit antérieurement. Quelquefois même, on les étendra comme une peau de tam-

bour sur un petit vase circulaire; on fera agir ensuite le réactif fixateur en le versant comme sur un tamis. C'est ainsi qu'on fixera l'épiploon du lapin, du chien, etc., par le nitrate d'argent, tout en colorant la substance unissante des cellules endothéliales; on traite ensuite par l'eau, l'alcool et on colore comme à l'ordinaire (Ranvier). Les membranes s'étalent aussi fort bien sur des fragments de liège. On les y laisse attachés pendant tout le cours des opérations; on les enlève seulement au moment de monter définitivement.

5° *Les membranes forment des vésicules; exemples : les poumons ou la vessie des batraciens, les poumons des reptiles, etc.* On injecte à l'aide d'une seringue le liquide fixateur de façon à distendre convenablement la vésicule. On lie avant d'enlever la canule pour empêcher le liquide de refluer. On place le tout dans un baquet contenant le même liquide qui a servi à l'injection. Pour le poumon de la grenouille ainsi que la vessie du même animal, le séjour de 24 heures dans l'acide chromique à $^3/_{1000}$ suffit. Avec d'autres réactifs, le temps sera plus ou moins long, suivant les circonstances. Les membranes fixées sont ensuite incisées et étalées sur un fragment de bouchon ou dans un petit baquet à fond de cire. Les lavages à l'alcool, la coloration, la déshydration ont lieu comme il a été indiqué précédemment.

6° *De minces objets, des infusoires, des cyclopes, de très petits vers peuvent être rangés en série sur le porte-objets pour des préparations didactiques.* On suit la marche des opérations indiquées en 1°, jusqu'à la déshydration et la clarification. Quand l'essence de girofle a agit, on ajoute quelques parcelles de paraffine que l'on dissout en chauffant doucement. On enduit une nouvelle lamelle du liquide de Schällibaum (1 partie de collodion, 4 parties d'essence de

girofle); on ajoute un petit fragment de paraffine que l'on dissout encore. On range en ligne et dans l'ordre qu'on le désire les objets sur la lame ainsi enduite. On porte le tout dans une étuve et l'essence de girofle est évaporée à sec; la paraffine que l'on a ajoutée est nécessaire pour assurer les objets contre la dessiccation. On en ajouterait même au liquide de Schällibaum. Sans paraffine, les objets sont séchés lors de l'évaporation de l'essence de girofle. Quand ce dernier liquide a disparu, on lave ensuite cette dernière substance par la térébenthine. Les séries ne se dérangent pas et restent fixées dans la mince couche de coton-poudre qui les fait adhérer à la lame. On recouvre d'une lamelle humectée de baume d'une moyenne consistance. Si l'on craignait, dans les débuts, le déplacement des objets après dessiccation, on recouvrirait d'une lamelle; on ferait pénétrer la térébenthine pour dissoudre la paraffine; on enlèverait par un fragment de papier buvard, tout en déposant une goutte de baume comme il a déjà été indiqué plus haut.

Nous allons donner maintenant la marche générale des opérations, la fixation se faisant sur la lame, dans le verre de montre ou de tout autre façon.

A l'aide du tableau qui suit, on pourra se guider sûrement dans le travail; on notera tous les détails des opérations à l'aide de lettres et de chiffres qui résumeront toutes les phases par lesquelles un organisme passe avant d'être préparé. Sur les étiquettes, il sera facile d'écrire ainsi en condensant, par quelques signes, les moyens employés pour obtenir une préparation convenable.

Ce tableau, ainsi que ceux que l'on trouvera plus loin, ont été exposés pendant nos conférences à la *Société de Microscopie,* en février 1884 et 1885. Ils ont été reproduits dans

le Bulletin IV de cette dernière année, ainsi que dans le *Bulletin scientifique du Département du Nord*, nos 9 et 10, et dans le *Journal de Micrographie de Pelletan*.

TABLEAU I.

PRÉPARATIONS D'OBJETS COMPLETS ET POUVANT DEVENIR TRANSPARENTS : INFUSOIRES, OEUFS DE PETITES DIMENSIONS, MINCES MEMBRANES, EMBRYONS ENTIERS, BLASTODERME D'OISEAUX ET DE MAMMIFÈRES, ETC.

A. — L'objet est placé sur une lame ou dans un verre de montre et immergé dans le *sérum artificiel* de Kronecker (eau distillée 1 litre, soude caustique 0 gr. 60, sel marin, 6 gr., ou bien dans le liquide où il vit); — s'il s'agit de très petits objets, on prépare sur une lame, puis le tout est recouvert d'une mince lamelle.

B. — Fixation par l'un ou l'autre des réactifs suivants :
- *a)* Acide osmique 1/1000.
- *b)* — chromique 3/1000.
- *c)* Liquide de Kleinenberg.
- *d)* Chlorure mercurique, solution saturée.
- *e)* Acide acétique glacial, etc.

C. — Traiter *successivement* par
- *a.* Alcool à 45 °/₀.
- *b.* — à 65 °/₀.
- *c.* — à 90 °/₀.

N. B. On parvient à remplacer, sous la lamelle, un réactif par un autre, en aspirant d'un côté à l'aide de papier-filtre, tandis que de l'autre côté on dépose une goutte du nouveau liquide, qui pénétrera facilement par capillarité.

D. — Colorer par l'un des réactifs suivants :
- *a)* Carmin picrique.
- *b)* — boracique.
- *d)* — aluné.
- *e)* — alcoolique.
- *f)* L'une ou l'autre des couleurs d'aniline.

E. — Traiter *successivement* par
- *a.* Alcool à 45 °/₀.
- *b.* — à 65 °/₀.
- *c.* — à 90 °/₀.

Pour monter dans la glycérine.

F^1. — Remplacer l'alcool par une goutte de glycérine (2 vol. eau + 1 vol. glycérine + quelques gouttes de carmin picrique).

G^1. — Entourer la lamelle, après avoir enlevé sur les bords toute trace de liquide, d'un cadre de paraffine de façon à fermer la préparation : pour cela, on chauffe un fil de fer courbé à angle droit; — on le place dans la paraffine et on applique celle-ci encore liquide sur les bords de la lamelle ; — on recouvre ensuite d'une couche de cire rouge dissoute dans l'alcool.

Pour monter dans le baume.

F^2. — Alcool à 100.

G^2. — Essence de girofle.

H^2. — Faire pénétrer sous la lamelle une goutte de baume de Canada dissous dans l'essence de térébenthine ou le chloroforme, si on a monté sous la lamelle. — Placer la lamelle recouverte de baume, avec une pince, sur l'objet.

Pour ranger les objets.

F^3. — Alcool à 100.

G^3. — Essence de girofle.

H^3. — Ajouter un peu de paraffine.

H^4. — Préparer une nouvelle lame que l'on enduit du liquide de Schallibaum (collodion 1 + essence de girofle 2).

H^5. — Evaporer l'essence de girofle au bain-marie ou à l'étuve.

H^6. — Laver la paraffine par la térébenthine.

H^7. — Placer la lamelle enduite de baume.

Ce tableau peut être modifié suivant la nature de l'organisme à étudier. C'est ainsi qu'après avoir traité comme il est indiqué en A, B, il suffira de passer à C et de n'employer qu'un alcool, *a* par exemple, de colorer D et d'effectuer tout de suite le traitement F^1, en laissant de côté la manipulation E.

Quand on voudra monter dans le baume, il sera toujours nécessaire de suivre la marche E *a*, *b*, *c*, — F^2, G^2, H^2.

Exercices. — Nous proposons aux débutants les exercices suivants :

1. — Dans l'intestin de la grenouille, au milieu des masses verdâtres qu'on y rencontre, on découvrira trois espèces d'infusoires : des *Opalines*, des *Nyctothères* et des *Balantidiums;* on prendra un peu du liquide intestinal que l'on délayera dans le liquide de Kronecker (A); puis on traitera suivant le tableau entier en employant en B le réactif *a* ou *d*.

On aura soin de mener de front plusieurs préparations; il sera possible de suivre les marches F^1 G^1 et F^2 G^2 H^2.

Si l'on monte dans la glycérine, on pourrait en C n'employer que l'alcool *a* et passer immédiatement en D*a* puis en F^1.

Temps : B*a*, 5 minutes; — C*a*, *b*, *c*, 2 à 3 minutes; — D*a*, 3 heures; — si l'on emploie Db, 4 heures. — E*a*, *b*, *c*, 2 à 3 minutes; — F^2, 5 minutes; — G^2 10 minutes.

Il sera facile de tenir note des manipulations effectuées à mesure qu'on les produit; — on aura toujours à se repentir de négliger ce conseil.

2ᵉ *exercice.* — Injecter à l'aide d'un tube effilé ou d'une seringue la vessie d'une grenouille en y introduisant de l'acide chromique $^3/_{1000}$; lier de façon que la membrane reste

bien distendue; laisser agir 24 heures; — le reste, comme l'indique le tableau.

Temps : C*a*, C*b*, C*d*, 3 heures; — D*a*, 4 heures.

Placer un fragment de la vessie sur une lame; — bien étaler en évitant de laisser sécher, traiter comme en E*b*, 10 minutes; — puis en F^1 et G^1.

Un autre fragment est traité à partir de D*a*, comme il est indiqué en E*a*, E*b*, E*c*, 15 minutes pour chaque alcool.; — F^2, 15 minutes; G^2, jusqu'à éclaircissement (10 à 15 minutes); — H.

On traitera ainsi les poumons du même animal, des membranes minces : le mésentère, l'épiploon des vertébrés.

Embryons de poulet de 30 à 50 heures (1). — Incubation naturelle ou artificielle; une simple étuve de Gay Lussac chauffée par une petite veilleuse suffit dans ce dernier cas; — ouvrir l'œuf dans le liquide A, tenu à 38 ou 40° de température; — enlever le blastoderme sur le jaune; — transporter dans un verre de montre contenant du liquide de Kleinenberg, laisser agir 2 heures; — C*a*, C*b*, C*c*, 15 minutes dans chaque liquide; — D*a*, 3 heures; — E*a* et E*b*, 15 minutes; — E*c*, 30 minutes; — F^2, 1 heure; — G^2, jusqu'à transparence (10 à 15 minutes); — H^2 du verre de montre, on transporte sur la lamelle enduite d'essence de girofle et on ajoute du baume liquide.

Étude de la spermatogenèse. — Dilacérer un fragment de testicule de grenouille ou de ver de terre dans liquide A; ajouter quelques gouttes de B*a* (2 minutes); — transporter quelques gouttes du liquide ainsi obtenu sur la lame; recou-

(1) Il sera question plus avant de l'embryologie et des méthodes spécialement employées dans les études de cette science.

vrir d'une mince lamelle; — *Ca*, *Cb*, quelques minutes; — *Da* ou *Db*, 2 heures; — *Ea*, *Eb*, *Ec*, quelques minutes; — F^1 et G^1.

Pour faire pénétrer les liquides sous la lamelle, on se servira de papier-filtre.

On traitera ainsi les cellules et fibres dilacérées en se pénétrant bien de cette idée que chaque organisme nécessite une méthode particulière en rapport avec la nature chimique des tissus.

TROISIÈME MÉTHODE.

DISSOCIATION.

Par la dissociation, on sépare mécaniquement les éléments que l'on veut étudier de tout ce qui les entoure; on les individualise en quelque sorte. Prenons quelques exemples : dans la grenouille, on trouve des *ascaris* qui contiennent des œufs à tous les états de développement. Il est nécessaire, pour suivre convenablement les différentes phases par lesquelles ceux-ci passent, de dilacérer non seulement ces vers, mais encore il faut séparer les œufs convenablement de tout ce qui les entoure. Les réactifs agiront ainsi plus rapidement et plus sûrement; de plus, dans l'étude des fibres, des cellules étrangères ne s'opposeront pas à l'examen par leur plus ou moins grande opacité. Si on voulait étudier les ovules de la grenouille, on choisirait un jeune animal; on détacherait l'ovaire, et les ovules seraient séparés par dissociation dans le sérum artificiel. Quelquefois, on aura recours avant la dilacération à des réactifs : l'alcool $1/3$, l'acide chromique à $1/1000$, qui, tout en fixant les éléments dans leurs formes, permettent

cependant de les séparer facilement par les modifications qu'ils font subir à la substance unissante. Ainsi, en étudiant l'épithélium vibratil, on détache, en disséquant, l'œsophage d'une grenouille; on fait agir pendant vingt-quatre heures l'alcool $^1/_3$; avec un scalpel, on racle ensuite l'épithélium de l'organe détaché et on dilacère avec soin et sous le microscope simple. La dilacération se fait ordinairement dans un liquide indifférent, le sérum de Kronecker, par exemple, surtout si on veut suivre les phases de développement d'œufs, alors que ceux-ci sont encore en vie. On emploie aussi le sérum iodé naturel ou artificiel; mais alors les éléments sont immédiatement frappés de mort. Quand il s'agit de séparer les éléments, la substance unissante sera modifiée par un réactif convenable.

Après l'emploi d'un liquide indifférent, il faudra fixer les cellules par un réactif approprié. Quant aux réactifs dissociants, ils sont ordinairement fixateurs. On procède au lavage à l'alcool, à la coloration, à la déshydration et le montage suivant la marche indiquée dans la seconde méthode. Une fois les éléments dissociés, on suivra la marche du 1er tableau.

Pour dilacérer, on se sert d'aiguilles emmanchées. On les repasse sur une pierre de façon à rendre les pointes très aiguës et très fines. On s'aide du microscope simple ou d'une loupe. Dilacérer au hasard, sans se guider, c'est risquer de ne rien faire de bon. On sépare ensuite les éléments, en plaçant les aiguilles convenablement et les tirant en sens contraires. Après quelques exercices, on acquerra l'habileté nécessaire; on fera agir ensuite les réactifs, comme il a été indiqué précédemment. Les dilacérations se font sur les lames ou dans des verres de montre.

QUATRIÈME MÉTHODE.

MÉTHODE DES COUPES.

La méthode des eoupes a fait des progrès considérables depuis que les proeédés de Giesbrecht, Sehällibaum et Threfall permettent de ranger méthodiquement en séries les seetions que l'on pratique à travers un organisme queleonque. Il est maintenant possible de reconstituer les rapports entre les organes d'un animal en dessinant ou en photographiant chaque eoupe (ou un certain nombre de coupes prises à des niveaux convenables), puis, en superposant les dessins. C'est ainsi que Fol et d'autres auteurs eneore ont pu faire l'anatomie de eertains embryons. Les eoupes ont aetuellement une importance capitale, soit que l'on fasse de l'histologie, soit que l'on fasse de l'anatomie eomparée. Les *procédés* mis en œuvre pour couper les objets sont nombreux. L'objet étant *fixé* et *durci* eonvenablement, il est débité en coupes tel qu'il est ou renfermé dans un support s'il est trop petit pour être manié faeilement, ou bien eneore, l'objet est imprégné d'une substanee, la paraffine, la celloïdine, etc., qui font eorps avee lui ; ce dernier moyen est toujours nécessaire quand les objets eontiennent des cavités. Mais avant qu'on dispose ainsi un organisme pour le couper, il faut qu'il ait subi une préparation dont nous allons nous oecuper.

FIXATION ET DURCISSEMENT.

La fixation a lieu par l'un ou l'autre des réactifs que nous avons étudiés préeédemment. On immerge les animaux dans

des baquets en verre ou en porcelaine de grandeur en rapport avec les objets que l'on étudie. Pour les petits êtres, des verres de montre, de petits cristallisoirs suffisent. La fixation a lieu comme dans les méthodes antérieures.

Pour qu'il puisse être sectionné, il est nécessaire qu'un objet soit assez dur pour ne pas s'écraser ou s'affaisser pendant l'opération. L'objet subit donc l'action des réactifs jusqu'à ce qu'il ait acquis une consistance suffisante. Les réactifs fixateurs commencent déjà à produire cette modification. Mais il en est dans lesquels on ne peut laisser les objets acquérir la dureté nécessaire. Le plus souvent, c'est dans l'alcool que le durcissement s'achève. On a soin de passer successivement d'un alcool à l'autre en graduant avec soin la concentration (70°, 90°, 100°). Le séjour dans l'alcool à 90° sera prolongé jusqu'à durcissement complet.

Dans bon nombre de circonstances, il est permis, quoique cette pratique tende à n'être plus suivie, de colorer l'objet en masse, après fixation et passage dans les différents alcools. Dans la plupart des cas, ce moyen est bon; il évite la coloration des coupes une à une. Quand on connaît la manière d'agir des réactifs, on parvient à des résultats excellents. Cependant, il arrivera que l'on doive colorer les coupes sur le porte-objet, parce que la coloration en masse serait défectueuse.

Nous avons fait connaître précédemment les liquides qui pouvaient être employés à durcir; ce sont : le liquide de Müller, d'Erliki, l'acide chromique, l'alcool, etc.

En résumé, voici les opérations que subira un objet avant d'être débité en coupe :

1° Fixation par l'un des réactifs étudiés précédemment;

2° Lavages à l'alcool au $^1/_3$, à 70°, et durcissement à l'alcool à 90°;

3° Coloration en masse;

4° Lavages à l'alcool et séjour dans l'alcool à 90°;

5° Souvent, il sera nécessaire d'amener dans l'alcool absolu.

Les opérations 3 et 4 ne sont pas indispensables si on colore sur le porte-objet.

Les coupes se font au rasoir, à main libre ou à l'aide d'appareils appelés microtomes. Nous nous occuperons plus loin de ces appareils. Nous allons maintenant étudier les différents procédés en usage qui permettent de couper les objets. Ceux-ci sont, le plus souvent, entourés d'une substance qui les protège pendant la manipulation, et qui, en même temps, dans la plupart des cas, leur donne la consistance nécessaire pour être sectionnés facilement : de là, le nom *d'enrobage* ou *d'inclusion* donné à cette opération par laquelle passe un objet immédiatement avant d'être coupé.

INCLUSION PAR LA GOMME ARABIQUE.

Un objet ayant été durci après fixation est placé, s'il sort de l'alcool, dans un peu d'eau pour enlever le premier liquide. On fend un cylindre de moelle de sureau longitudinalement et on creuse sur les deux faces planes, deux petites fossettes, qui, réunies en appliquant les deux fragments de sureau l'un contre l'autre, comme avant la section, forment une petite chambre ayant exactement le même volume que l'objet que l'on veut couper. Les fossettes et l'objet sont humectés d'une dissolution de gomme demi-sirupeuse. Enfin, l'objet est placé dans la chambre obtenue par la réunion

des deux fossettes; on lie avec du fil fin et on laisse dans la gomme un temps assez long pour que l'imprégnation soit suffisante (six à douze heures suffisent). On transporte dans l'alcool. Ce dernier précipite la gomme; l'objet est ainsi inclus dans la gomme précipitée entre les fragments de sureau; le tout est devenu une masse adhérente dans toutes les parties. Le séjour dans l'alcool doit être suffisamment prolongé pour qu'il y ait durcissement complet. On peut d'ailleurs laisser dans l'alcool jusqu'au moment où l'on trouve le temps de sectionner. On coupe à main libre ou au microtome; les sections sont déposées dans un baquet avec de l'alcool; à chaque coupe, on mouille le rasoir avec ce dernier liquide. A l'aide d'une spatule, on porte les coupes sur la lame où elles sont lavées à l'eau pour enlever la gomme. Elles peuvent être fixées, d'ailleurs, sur le porte-objets par la méthode de Flögel, que nous décrirons plus loin.

Les fragments de foie de porc durcis par l'alcool remplacent très bien la moelle de sureau. On fend un petit bloc de foie dans lequel on creuse la cavité pour y introduire l'objet à couper; on humecte le tout de gomme et l'on précipite celle-ci par l'alcool comme précédemment. Ces méthodes étaient les seules employées il y a dix ans; depuis, elles sont abandonnées, à tort, car, convenablement conduites, elles donnent des résultats rapides. On y aura recours quand on voudra couper des objets compacts et sans cavités, par exemple, des membranes, des petits fragments de cerveau, de rein ou de foie, etc. Il importe, en sectionnant, d'humecter constamment le rasoir. Les coupes sont montées par ce procédé, comme il sera indiqué dans le tableau II. Les débutants feront bien de s'exercer à couper quelques objets par cette

méthode et cela à main levée, c'est-à-dire sans se servir du microtome. Comme exercice, on choisira la peau de grenouille. Un fragment d'un centimètre carré sera traité dans un verre de montre par l'acide osmique à $^1/_{1000}$; on laissera agir pendant dix minutes, on lavera à l'eau, puis à l'alcool à 70° (trente minutes); on transportera dans l'alcool à 90° (un jour); la coloration aura lieu par le picro-carmin (douze heures); on repassera par l'alcool à 70° et à 90° (six heures). On inclura dans la gomme, comme nous venons de l'indiquer.

Par la gomme, on peut encore faire adhérer un objet à couper sur un morceau de liège, qui sert ainsi de support pour le maniement plus facile ou pour la fixation dans la pince du microtome. L'objet étant mouillé à l'eau, on le dépose sur un fragment de liège convenablement taillé et enduit de gomme sirupeuse comme si on voulait le coller. On place le tout dans l'alcool, qui coagule la gomme en la précipitant, et l'on obtient ainsi une adhérence parfaite.

Dans ce procédé, on colore ou bien en masse avant de sectionner ou bien après avoir coupé; dans ce dernier cas, les coupes se colorent sur porte-objet.

TABLEAU II.

MOELLE DE SUREAU OU LE FOIE DE PORC.
INCLUSION DANS LA GOMME. — MARCHE DES OPÉRATIONS.

A. — Fixation des éléments histologiques par l'un ou l'autre des réactifs.	*a*) Acide osmique $^1/_{100}$ à $^1/_{1000}$. *b*) — chromique $^1/_{100}$ à $^1/_{1000}$. *c*) Liquide de Kleinenberg. *d*) Chlorure mercurique, solution saturée.
B. — Durcissement lent en passant *successivement* dans	*a*) Alcool à 45 %. *b*) — à 65 %. *c*) — à 90 %. *d*) — à 100 %.
C. — Coloration par l'un ou l'autre des réactifs ci-indiqués.	*a*) Picro-carmin. *b*) Carmin borique. *c*) Carmin boracique alcoolique. *d*) Carmin aluné. *e*) Acide carminique.
D. — Traiter successivement par	*a*) Alcool à 45 %. *b*) — à 65 %. *c*) — à 90 %.

E. — *a*) Fendre longitudinalement un cylindre de moelle (ou bloc de foie durci), y pratiquer deux fossettes qui, en se réunissant, formeront un creux ayant juste la capacité nécessaire pour contenir l'objet.
b) Humecter les fossettes d'une dissolution de gomme et y placer l'objet enduit également de gomme; — lier par quelques tours de fil.
c) Plonger le tout dans l'alcool à 90° et attendre le durcissement (6 à 12 heures).

F. — Couper au rasoir et à main libre et mouiller chaque fois le rasoir; les sections sont déposées dans l'alcool.

G. — *a*) Les sections sont placées sur une lame.
b) Une goutte d'eau y est ajoutée; la gomme se dissout; on enlève les fragments de foie ou de moelle.

H¹. — *Pour monter dans le baume :*

a) On enlève l'eau et on lave à l'alcool à 70°, 90°, 100° pour déshydrater.
b) On clarifie par l'essence de girofle.
c) On humecte de baume liquide une lamelle; avec une petite pince, on la place convenablement.

H². — *Pour monter dans la glycérine :*

*a*¹) On humecte une lamelle de glycérine formique et on la dépose sur la coupe, en ayant soin d'enlever l'eau au préalable.
*a*²) Si l'objet est petit, on place la lamelle sans glycérine; on soutire l'eau d'un côté à l'aide d'un fragment de papier-filtre, tandis que, de l'autre, on fait pénétrer la glycérine.
b) On ferme la préparation à la paraffine et on recouvre cette dernière d'une couche de laque dissoute dans l'alcool.

Observation. — Quand on voudra, au lieu de colorer en masse, produire cette opération après avoir sectionné, on passera C et D; on procédera comme il est indiqué en E, F, G. Au lieu de passer tout de suite en H[1] ou H[2], on colorera par quelques gouttes de picro-carmin ou d'un autre réactif sur la lame même et en plaçant sur la chambre humide pour éviter l'évaporation; la teinte obtenue, on continuera comme il est indiqué en H[1] ou H[2].

Comme exercice, on prendra un fragment de peau de grenouille ou l'extrémité (4 à 5 mm.) de la queue d'un têtard de grenouille ou de triton.

Temps pour la peau de grenouille.	*Temps pour la queue du têtard.*
A. — *a*) $^1/_{100}$, 10 min.; lavage à l'eau, 2 min.	A. — *b*) $^3/_{1000}$.
B. — *a*) 15 min.; — *b*) 15 min. — *c*) un jour; — passez *d*).	B. — *a*) 6 heures; — *b*) 6 heures; *c*) 1 jour; — passez *d*).
C. — *a*) un jour.	C. — *a*) 3 heures.
D. — *a*) *b*) 2 heures; *c*) un jour.	D. — *a*) *b*) 1 heure; — *c*) 6 heures.
E. — *c*) 6 heures.	E. — *c*) 6 heures.

H[1]. — *a*) chacun des alcools quelques minutes.
b) 5 minutes.
c) immédiatement.

INCLUSION DANS LA GÉLATINE GLYCÉRINÉE.

Procédé de Kaiser.

(Botanique Centralblatt 1880.)

Nous avons déjà dit que l'on obtenait la gélatine glycérinée en chauffant une partie de gélatine et six parties d'eau distillée; la dissolution achevée, on ajoute six parties de glycérine. Par cent gr., on ajoute un gr. d'acide phénique. Si le liquide contenait des impuretés, on filtrerait

encore chaud (1). Par le refroidissement, on obtient une masse transparente et suffisamment dure pour être coupée.

L'objet que l'on veut inclure ayant été *fixé, durci* et *coloré* est lavé à l'eau distillée pour enlever l'alcool. Par la chaleur, on amène à l'état liquide une certaine quantité de gélatine glycérinée sans trop dépasser la température du point de liquéfaction. L'objet y est immergé. On chauffe pendant le temps nécessaire pour que la masse pénètre suffisamment les tissus. Dans une petite boîte rectangulaire en carton, que l'on fabrique avec une carte de visite, dans laquelle on a versé la gélatine glycérinée liquide, on fixe convenablement la pièce. Par le refroidissement, la masse devient dure ; on peut la couper au rasoir, que l'on mouille constamment. Le microtome peut être employé en prenant la même précaution.

D'après l'auteur de la méthode, la gélatine est enlevée des tissus par un mince jet d'eau chaude, alors que les coupes sont déposées sur la lame. Il est plus convenable de chauffer celle-ci en l'humectant d'une goutte d'eau jusqu'à disparition de gélatine. On lave ensuite à l'alcool à 70°, à 90°, à 100°; on déshydrate, on clarifie par l'essence de girofle et on monte dans le baume ou bien, après lavage à l'eau, on ajoute la lamelle enduite de glycérine.

Si l'on n'avait pas coloré, on le ferait sur le porte-objet, en ajoutant quelques gouttes d'un réactif colorant et en plaçant ensuite sous la chambre humide.

Le plus souvent, la masse, par le refroidissement seul, ne sera pas suffisamment dure pour être coupée convenablement.

(1) Pour filtrer la gélatine, on employera l'entonnoir servant à filtrer la paraffine (page 305).

En plaçant dans l'alcool à 90° la pièce préparée et contenue dans la gélatine glycérinée, on arrive à un durcissement convenable.

Nous ferons remarquer, avec l'inventeur du procédé, que ce moyen d'inclusion a l'avantage de laisser voir l'objet à couper, puisque la masse est transparente.

Kleb, en 1869 *(Arch. Mik. Anat.)*, avait déjà préconisé une solution de colle de poisson, à laquelle il ajoutait la moitié de son volume de glycérine. Il durcissait par l'alcool ou l'acide chromique.

Stricker recommande une solution sirupeuse de gomme, dans laquelle il inclut les objets. La gomme liquide est placée dans une petite boîte en carton mince, où l'on dispose la pièce à couper; on coagule la gomme en plaçant quelques jours dans l'alcool; l'objet à couper devra, en sortant de l'alcool et avant d'être inclus, subir un lavage à l'alcool.

Joliet *(Arch. Zool. exp. et gén. 1882)* recommande un mélange de gomme, à consistance d'un épais sirop, auquel il ajoute un peu de glycérine. On fait pénétrer ce mélange dans les tissus en immergeant l'objet à étudier. On laisse ensuite sécher la masse à l'air libre; après trois jours, on peut couper. L'auteur a inclus des *salpes et des pyrosomes* par ce procédé. Hertwig a employé un moyen analogue pour les cténophores. *(Jén. Zeitsch., 1880.)*

TABLEAU III.

INCLUSION DANS LA GÉLATINE GLYCÉRINÉE DE KAISER.

A. — L'objet est traité comme il est indiqué en A, B, C, D du tableau II; puis transporter dans l'eau pour enlever l'alcool.

B. — Il est placé jusqu'à saturation dans la solution ci-contre, tenue liquide par la température d'un bain-marie (ne pas dépasser 60°).

Glycérine,	6 parties.
Gélatine,	1 »
Eau distillée,	7 »
1/2 % acide phénique.	

C. — *a)*. On oriente convenablement l'objet dans une petite boîte, dans laquelle une petite quantité de gélatine glycérinée commence à se durcir de façon à offrir une surface assez résistante pour que l'objet reste là où on le place. — *b)*. On ajoute de la glycérine gélatinée liquide.

D. — *a)*. On laisse refroidir; — *b)*. On durcit en plaçant dans l'alcool à 70 %, puis à 90°.

E. — On coupe en mouillant constamment le rasoir avec de l'alcool à 70 %.

F^1. — On monte dans la glycérine si l'objet a été coloré au préalable.

F^2. — Si l'on n'a pas teint, on colore sur la lame, en masse, comme il est indiqué à la suite du tableau II en observation. — Pour monter, on agira suivant les indications données en H^1, H^2 du tableau II.

Exercice. — Pour acquérir la pratique de ce procédé, nous proposons au débutant de fixer, par l'acide chromique $^3/_{000}$ ou le liquide d'Erliki, un lombric ayant 2 à 3 millimètres de diamètre; — après un séjour de 24 à 36 heures dans l'une ou l'autre de ces solutions, on traitera comme il est indiqué dans le tableau II en B*a*, B*b*, 6 heures, B*c*, un jour; — C*a*, 24 heures; — D*a*, D*b*, 6 heures, D*c*, un jour. — *On reprendra ensuite les manipulations du tableau III* à partir de A (quelques minutes); B et C, le temps de réaliser les manipulations; — D*b*, 6 à 12 heures; F^1. Pour monter dans le baume, reprendre les opérations à partir de H^1. On fera bien de s'exercer au montage d'un certain nombre de coupes dans la glycérine et d'un certain nombre dans le baume.

INCLUSION DANS L'ALBUMINE.

Procédé de Calberla et Ruge.

On écrase le contenu entier d'un œuf dans un mortier en porcelaine; on filtre à travers un linge. On fabrique une petite boîte en carton, comme pour l'inclusion à la paraffine; l'objet y est convenablement orienté à l'aide d'épingles que l'on pourra enlever après durcissement. On remplit la petite boîte de l'albumine rendue parfaitement liquide et légèrement jaunâtre.

Sur un vase plat, en fer blanc ou en cuivre, à moitié rempli d'eau, on dépose une plaque métallique, formant couvercle; on recouvre d'une cloche; on installe sous celle-ci un cristallisoir contenant de l'alcool fort; une plaque de zinc, percée de trous, y est fixée, puis, sur celle-ci, on dépose les petites boîtes contenant l'albumine. L'atmosphère de la cloche sera bientôt saturée de vapeurs alcooliques; pour cela, on chauffe, à l'aide d'une veilleuse ou d'une petite flamme à gaz, le vase contenant de l'eau et qui joue le rôle de bain-marie. La température ne doit pas dépasser 30° sous la cloche. Après deux ou trois jours, alors qu'on aura obtenu une certaine coagulation, les boîtes sont placées dans l'alcool où l'albumine se durcira complètement. On fixe dans la pince si on coupe au microtome, on sectionne en mouillant constamment le rasoir à l'alcool.

Les différentes méthodes que nous venons de décrire permettent aussi de faire des coupes à main levée.

Observations. — Pour fixer de petits objets, on a conseillé de durcir légèrement, là où l'on veut les orienter, un

peu d'albumine en y laissant tomber une goutte d'alcool. Le procédé qui vient d'être décrit présente un désavantage : on ne peut que difficilement enlever l'albumine; car aucun dissolvant ne sera employé efficacement.

Nous croyons inutile de donner ici un tableau représentant la marche des manipulations du procédé que nous venons de faire connaître. Comme exercice, on choisira le même exemple que pour le tableau III.

INCLUSION DANS LE SAVON.

(Procédé de Pölzam.)

Du savon blanc est séché et blanchi au soleil pendant deux ou trois jours; on le réduit en poudre; on le mélange à l'alcool pour en obtenir une masse pâteuse. On ajoute de la glycérine.

Voici les proportions de chacune des substances qu'il faut employer :

Savon,	10 p. en poids	Faire bouillir jusqu'à ce qu'on obtienne une masse sirupeuse et transparente.
Glycérine,	22 » »	
Alcool à 98°,	35 » »	

L'objet étant traité par l'alcool à 90 % est transféré dans une petite quantité de la masse précédente, que l'on tient liquide en chauffant au bain-marie à une température qui ne doit pas dépasser 50 %. On inclut ensuite à la manière ordinaire dans une petite boîte en papier. On coupe à sec et on enlève le savon par l'eau ou l'alcool dilué.

D'après Salensky, cette méthode est excellente et surtout applicable aux recherches embryologiques. *(Morph. Jahr. von Gegenbaur, 1877.)*

Par cette méthode, on peut teindre en masse ou après avoir coupé. On monte dans la glycérine ou dans le baume.

Flemming prépare la masse en prenant du savon blanc sans glycérine; il dissout en chauffant dans $^1/_3$ à $^1/_2$ d'alcool à 90°. Pour le reste, on procède comme il est indiqué ci-dessus. Cette méthode est excellente pour les petits objets.

Nous nous sommes servi souvent du savon comme masse d'inclusion quand il s'agissait d'objets qui ne pouvaient être inclus dans la paraffine sans s'altérer. Nous en faisons constamment usage pour prendre rapidement connaissance de la structure d'un organisme comme moyen d'investigation préliminaire. Il suffit, en effet, qu'une pièce se trouve placée dans l'alcool pour que, sans autre intermédiaire, elle soit susceptible d'être enrobée dans le savon. Voici comment nous procédons : nous choisissons comme masse le savon à la glycérine transparent, légèrement jaunâtre, mais non coloré, et que l'on vend partout, chez les parfumeurs, sous le nom de savon à la glycérine. Nous en faisons deux solutions dans l'alcool; pour cela, nous coupons en minces tranches.

a) La première solution est faite avec *1 partie de savon en poids* et *5 parties d'alcool.*

Elle est liquide à une température de 40° à 45°.

b) La seconde solution contient *1 partie en poids de savon* et *2 $^1/_2$ à 5 parties d'alcool.*

Pour inclure, l'objet sortant de l'alcool à 90° ou à 100° est placé dans la solution *a*, contenue dans une capsule et maintenue liquide par la température de 40° à 45° au bain-marie. Après quinze à trente minutes, suivant les dimensions de l'objet, celui-ci est transporté dans la solution *b*, maintenue en fusion par une température de 55° à 60°.

Dans un cadre d'inclusion ou dans une petite boîte en carton (voir : Inclusion dans la paraffine), on verse la solution *b* alors qu'elle est encore liquide; elle se solidifie rapidement. On oriente l'objet convenablement, et sans trop tarder, on recouvre d'une nouvelle couche de la même solution. On laisse refroidir; après quelques heures, on peut couper. Si on abandonne la masse de savon à l'air libre, une partie de l'alcool s'évapore et le tout devient de plus en plus dur. C'est ainsi qu'on laisserait se durcir une masse qui serait primitivement trop peu consistante en l'exposant à l'air pendant quelque temps. Mais quand la dureté est suffisante, il est nécessaire de conserver les pièces préparées dans des flacons bouchés, afin d'éviter l'évaporation de l'alcool.

A notre avis, on peut couper à sec ou en mouillant le rasoir; le savon est enlevé par l'alcool.

Pour étudier cette méthode, on exécutera les manipulations du tableau IV.

TABLEAU IV.

INCLUSION DANS LE SAVON.

1. Moelle épinière de souris ou de grenouille, durcie par le liquide Müller ou d'Erliki (2 jours).
2. Laver rapidement à l'eau.
3. Alcool au $^1/_3$ (1 h.); — à 70° (1 h.); — à 90° (1 jour).
4. Colorer au picro-carmin (1 jour).
5. Alcool $^1/_3$ (1 h.); — à 70° (1 h.); — à 90° (2 jours).
6. *Solution de*

Savon à la glycérine,	1 partie	Maintenir liquide au bain-marie à 45°, 1/2 heure.
Alcool à 90°,	2 »	

7. *Solution de*

Savon à la glycérine, 1 p. } Maintenir liquide au bain-
Alcool à 90°, 2 1/2 » } marie à 55°-60°, 1 heure.

8. Orienter convenablement dans une boîte en carton et verser la masse du n° 7. Couper ensuite.

9^1. Laver le savon à l'alcool.

10^1. Placer une lamelle enduite de glycérine picro-carminatée. Si les coupes doivent être rangées en série, après avoir sectionné, on suivra la marche suivante :

9^2. Verser sur un porte-objet une dissolution de gomme dans l'eau à $^5/_{100}$.

10^2. Ranger les coupes sur la lame encore humide et laisser sécher.

11^2. Après dessiccation, laver le savon à l'alcool, les coupes sont parfaitement adhérentes.

Ou bien

12^1. Appliquer une lame enduite de glycérine.

N. B. Avec cette méthode, il vaut mieux monter dans la glycérine.

12^2. Laver à l'alcool absolu.

13. Clarifier par l'essence de girofle.

14. Appliquer une lame enduite de baume.

Observation. — Un objet suffisamment durci et coloré sortant de l'alcool à 90° sera traité suivant la marche de ce tableau à partir de 6.

INCLUSION DANS LE COLLODION ET LA CELLOÏDINE.

C'est à Duval que l'on doit l'introduction dans la technique du collodion comme masse d'inclusion. Les diverses modifications qui ont été apportées depuis au procédé de cet

auteur ont fourni la méthode que nous allons décrire, et qui consiste à faire pénétrer dans la masse même des tissus le collodion que l'on durcit après par l'alcool.

TABLEAU V.

MARCHE DES OPÉRATIONS.

A. L'objet, après fixation, et coloration, si on le désire, est transporté dans l'alcool absolu, puis dans un mélange d'alcool et d'éther.

B. Il séjourne, ensuite, dans du collodion peu concentré. L'alcool et l'éther sont remplacés dans les tissus par le collodion. Le temps pour que l'imbibition se fasse varie selon le volume de la pièce.

C. Le collodion étendu est remplacé par une solution de la même substance, mais presque sirupeuse. On laisse la pénétration se produire.

D. On verse du collodion dans une petite boîte. On oriente l'objet. En abandonnant à l'air, il se forme à la surface une petite pellicule.

E. On durcit, en plaçant la boîte entière dans l'alcool à 70° ou bien encore dans le chloroforme.

F. On coupe à main levée et on monte dans la glycérine.

F'. En dissolvant, par un mélange d'éther et d'alcool, le coton-poudre qui est intercalé dans les tissus, on monte, ensuite, dans le baume ou le Dammar. Mais si l'on clarifie par l'essence de girofle, il arrive qu'il se forme des granulations dans les préparations. Cette méthode est généralement remplacée par le procédé à la celloïdine de Schiefferdecker et Merkel.

INCLUSION DANS LA CELLOÏDINE.

(Procédé de Schiefferdecker.)

On peut se procurer la celloïdine chez E. Schering, chimiste à Berlin (1); elle est fournie en tablette de 40 à 50 grammes. Elle est complètement soluble dans parties égales d'alcool et d'éther. Pour le procédé qui nous occupe, deux solutions sont nécessaires : l'une est à consistance sirupeuse, l'autre est à l'état liquide. Pour dissoudre la celloïdine, on la coupe en petits morceaux que l'on place dans parties égales d'alcool absolu et d'éther sulfurique.

TABLEAU VI.

A. La pièce à couper venant de l'alcool absolu est placée dans l'éther additionné de son volume d'alcool absolu.

B. Après quelques heures, un jour même, suivant l'épaisseur de l'objet, on le transporte dans la solution liquide de celloïdine.

C. La pénétration de ce dernier liquide étant suffisante (quelques heures à un jour), on place dans la solution sirupeuse de celloïdine.

D. Dans une boîte de papier contenant de la celloïdine sirupeuse, on oriente l'objet.

E. On laisse, à l'air libre, évaporer une certaine quantité d'éther, de telle sorte qu'il se forme à la surface une pellicule de celloïdine.

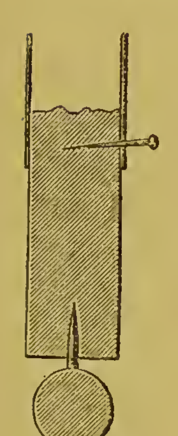
(1) M. Drosten, rue des Boiteux, Bruxelles, fournit la celloïdine de Schering au même prix que ce dernier.

F. On durcit, en déposant la petite boîte dans de l'alcool à 82 p. c. pendant 24 heures, ou tout au moins pendant le temps nécessaire pour produire le durcissement.

G. On coupe, en mouillant constamment le liquide avec de l'alcool à 82°.

I¹. — On monte dans la glycérine.	I². *a*) On déshydrate les coupes sur le porte-objet par l'alcool absolu. *b*) On clarifie par l'essence de bergamote ou par l'huile d'origan. *c*) On place le couvre-objet enduit de baume.

Observation. — Blochmann recommande d'inclure sur un bouchon, autour duquel on aurait tourné un fragment de papier, qui formerait ainsi les parois latérales d'une petite boîte, tandis que le bouchon en serait le fond. Une petite balle de plomb, attachée à la face inférieure du bouchon, oblige celui-ci à rester au fond de l'alcool (fig. 85).


Fig. 85.

On colore en masse ou bien sur le porte-objet, après avoir coupé, en immergeant les sections dans un réactif convenable.

Dans ce dernier cas, les opérations doivent se pratiquer comme nous l'avons indiqué dans les tableaux précédents.

Nous proposons aux débutants, comme exercice, de couper, par cette méthode, un cerveau d'une grenouille. Il suffira de disséquer un sujet dans l'acide chromique, $^3/_{1000}$, ou dans le liquide d'Erliki.

Lavage à l'eau; — séjour dans le réactif qui précède, 24 heures.

Alcool à 70°, un jour; — alcool à 90°, jusqu'à durcissement complet, 2 jours; — coloration en masse par le picro-carmin ou l'acide carminique; — alcool à 70°, à 90°, successivement environ 6 heures; — alcool à 100°, 6 heures; — 1 partie éther + 1 partie alcool absolu, 6 heures.

B, 6 heures; — C, 6 heures; — E et F, le temps nécessaire aux opérations; — G, 12 heures; — H, traiter une partie des coupes suivant I^1 et une autre partie suivant I^2.

Divers auteurs ont apporté à la méthode de Schiefferdecker des modifications qui laissent cependant intacte la base de la méthode.

C'est ainsi que l'on a remarqué que des bulles se formaient quelquefois dans la masse de celloïdine. On a proposé, pour obvier à cet inconvénient, de laisser à l'air libre une certaine quantité de liquide, de façon à produire un certain durcissement avant de plonger dans l'alcool. D'autres changements portent surtout sur la façon d'inclure. Le Dr Freeborn *(Amer. Mont. Mic. Journ. 1884)* propose les moyens suivants : Après avoir opéré d'une façon à peu près semblable à ce qui est indiqué en A, B, C, il recouvre la surface unie d'un bouchon d'une épaisse couche de celloïdine sirupeuse; il laisse sécher. L'objet (traité comme en A, B, C) est orienté.

Sur la surface du bouchon, on enduit, pour la recouvrir, de celloïdine sirupeuse. On laisse sécher en partie, et on porte dans l'alcool à 80° pendant 36 heures. Dans l'opération qui précède, on entoure le bouchon de papier, de façon

à former ainsi une petite boîte; il sera de la sorte plus facile d'ajouter les couches de celloïdine. On termine, comme il est indiqué ci-haut, pour couper, teindre, déshydrater, clarifier et monter.

On a proposé, afin de mieux fixer dans la pince du microtome, d'entourer le fragment de colloïdine durci d'une couche de paraffine.

INCLUSION PAR LA CONGÉLATION.

Tous les systèmes de microtomes portent, comme accessoire, un appareil à congélation par l'éther. Le procédé le plus simple pour congéler serait de prendre des pièces fraîches, de les placer sur la plaque du congélateur avec un peu d'eau et de refroidir jusqu'à durcissement convenable. Par ce procédé primitif, il se forme à l'extérieur des objets des cristaux de glace qui peuvent endommager le rasoir et produire, en outre, des lacunes artificielles dans les tissus.

Halmiton (*Journal of Anat. and Phys., 1878*) propose de faire séjourner la pièce dans un sirop de sucre formé de 60 grammes de cette substance et de 30 grammes d'eau. On évite ainsi les cristallisations.

Cole (*Méthode of de Microscopical Research, 1884*) immerge les tissus assez longtemps dans un mélange de mucilage de gomme (5 parties) et de sirop de sucre (3 parties). Il ajoute quelques gouttes d'acide phénique.

Le mucilage de gomme est obtenu en plaçant 120 grammes de gomme dans 180 grammes d'eau distillée. Le sirop de sucre est fait en dissolvant 372 grammes de sucre dans 37 centilitres d'eau chaude.

Pour congéler, on met d'abord un peu du mélange sur la plaque du congélateur; la pièce y est déposée; puis, on refroidit.

D'après Sollas, on peut se servir de la gélatine pour la congélation des objets; ceux-ci sont transportés dans une dissolution de gélatine liquide jusqu'à pénétration. On procède comme il est indiqué ci-dessus pour les autres masses recommandées.

Si les tissus n'ont pas été fixés au préalable, on peut y procéder sur le porte-objet; on colorera à la manière ordinaire, puis on montera dans la glycérine ou le baume.

Dans certains cas, la méthode de congélation sera très utile.

C'est ainsi que nous avons obtenu des résultats en congélant des larves de salamandres vivantes, et les coupant quand elles étaient suffisamment dures; sans fixation ni coloration, en portant sur la lame du microscope, nous avons pu voir de superbes figures karyokinétiques des cellules en division dans les divers tissus.

INCLUSION DANS LA PARAFFINE.

La plupart des auteurs qui ont eu l'occasion de se servir de la paraffine comme masse d'inclusion ont essayé d'apporter quelques perfectionnements aux différentes manières employées anciennement.

Il en est résulté que cette méthode d'enrobage est, à ce moment, la meilleure, celle que l'on choisira dans la plupart des cas qui se présentent en anatomie comparée et en histologie. Elle peut donner des coupes de 0,005 m/m; pour des

objets de moyennes dimensions et avec un microtome, il est facile d'obtenir des séries de coupes de 0,001 m/m. Enfin, avec un peu d'attention, il est possible d'obtenir la suite complète des coupes que l'on peut faire à travers un organisme. Nous apporterons un soin particulier à faire connaître tous les progrès réalisés dans la pratique de cette méthode. Nous la décrirons d'abord le plus simplement que possible, évitant les détails ou les complications qui ne sont en usage que dans les cas difficiles. Nous donnerons ensuite une marche analytique de la méthode, comme nous l'avons fait précédemment.

Pour inclure un objet dans la paraffine, il faut non seulement l'entourer de cette substance, mais encore il est nécessaire que tous les tissus en soient complètement imprégnés. Si des interstices ou des cavités existent dans les pièces, elles doivent être remplies par la paraffine; en d'autres termes, tout, objet et paraffine, ne doit faire qu'un seul corps compact et sans méats, de quelque nature que ce soit. Pour mieux fixer les idées, prenons un exemple. Supposons qu'un animal, un têtard, par exemple, soit coupé par une méthode par laquelle la masse d'enrobage ne pénètre pas. En sectionnant vers le milieu du corps, on coupera l'intestin en même temps que les parois de la cavité viscérale; or, comme sur la coupe rien ne rattache l'intestin aux autres parties, il ne sera pas possible d'obtenir les sections complètes; des fragments d'intestin se détacheront; on n'aura de la sorte aucune idée des rapports des organes. Mais si, par un moyen quelconque, on imbibe de paraffine, en la faisant pénétrer à travers les tissus, tout le corps de l'animal, de telle sorte que la cavité viscérale en soit complètement remplie, on

procédera faeilement au sectionnement, et là où il n'existe rien entre les parties de la coupe, la paraffine tiendra lieu de support. Les seetions seront transportées sur un porte-objet, et l'on y dissoudra la paraffine par un liquide convenable.

Les coupes des objets inelus dans la paraffine s'enroulent plus ou moins faeilement pendant le travail. Pour chaque masse d'inclusion, l'expérienee le prouve, il existe une température où, pendant le travail, l'enroulement ne se produit pas. Cette température est en relation intime avec celle de la fusion de la substanee; il s'ensuit que si l'on parvient à obtenir un mélange à point de fusion connu, on saura aussi qu'à une eertaine température les coupes ne se reeoquilleront pas. Il importe done de pouvoir obtenir des paraffines à diverses fusibilités, pour les mélanger de façon à former une masse à fusion déterminée. Nous nous occuperons plus tard d'un appareil permettant d'obtenir la paraffine à diverses fusibilités.

Pour le moment, il nous suffira de savoir que, pour une température de 18° à 22°, il faut un point de fusion de 50° à 54°. D'ailleurs, les eoupes de petits objets (1 millimètre de diamètre) s'enroulent beaueoup moins. Nous verrons aussi qu'il est possible d'empêeher, dans une eertaine mesure, l'enroulement par des instruments plus ou moins compliqués et même par une simple manœuvre. Eneore une fois, nous ne pouvons entrer dès maintenant dans ees détails; nous voulons aetuellement faire saisir l'essence de la méthode en prenant le eas le plus simple.

1. — Après fixation par un réaetif eonvenable et passage aux différents alcools pour amener le durcissement convenable, on colore en masse (on peut colorer sur le porte-

objet). On traite successivement par la suite des alcools pour arriver à l'alcool absolu où l'objet est complètement déshydraté.

2. — *a)*. L'alcool absolu à froid est incapable de dissoudre la paraffine; il faut donc remplacer ce liquide par un dissolvant convenable. On choisit ordinairement la térébenthine ou le chloroforme; mais la benzine, l'essence de girofle, l'essence de pétrole et le xylol donnent aussi des résultats convenables.

Si l'on choisit comme dissolvant la térébenthine, il faudra passer graduellement d'un liquide à l'autre en transportant les pièces successivement dans les solutions suivantes :

1	volume	de thérébenthine	+ 2	volumes	d'alcool.
1	»	»	+ 1	»	»
2	»	»	+ 1	»	»

b). Puis, enfin, dans la térébenthine pure.

Cette marche ne sera employée qu'avec des tissus qui ne courent pas le risque d'être altérés par le séjour dans la térébenthine. Avec les petits objets et les pièces délicates, on se servira du chloroforme comme dissolvant; voici comment :

Le sujet à couper, après avoir subi le traitement indiqué en 1, sera placé avec de l'alcool absolu dans un tube d'essai (tube à réaction). On remplira de chloroforme une petite pipette de 2 à 3 centimètres cubes de capacité. On la ferme avec le doigt à la partie supérieure. On en introduit la pointe au fond du tube d'essai et on laisse couler lentement le chloroforme. Dans le tube, il se forme deux couches : l'inférieure est du chloroforme; la supérieure est de l'alcool. Entre les deux, l'objet flotte. Mais après quelque temps, les

liquides se mélangent par diffusion et l'objet tombe bientôt au fond du tube. On transporte alors l'objet dans le chloroforme pur, où il se sature de ce liquide.

3. — Il s'agit maintenant de remplacer la térébenthine ou le chloroforme dans les tissus par la paraffine elle-même. Pour cela, on ajoute successivement au liquide employé (térébenthine ou chloroforme) de la paraffine finement coupée jusqu'à saturation; on chauffe au bain-marie vers 25-30°; on élève même la température jusqu'à 50° sans inconvénient. Après quelque temps, l'objet est transporté dans la paraffine pure, chauffée au bain-marie entre 55-60°. Le temps de cette immersion varie suivant la grosseur des objets; ceux qui ont des cavités, et qui contiennent des organes que l'on désire retrouver en place après avoir coupé, il faut souvent plus d'une heure, quelquefois même de 12 à 24 heures avec de gros objets.

Si l'objet est plat, on pourra le monter ensuite sur un fragment de liège, à face supérieure bien plane, que l'on enduira au préalable de paraffine liquide; on laissera refroidir; on entourera même d'un rebord de papier, de façon à former une petite boîte; puis, l'objet étant convenablement orienté, on le recouvrira d'une couche de paraffine; on laissera ensuite refroidir, pendant plusieurs heures, ou même un jour, ce qui est quelquefois nécessaire.

Dans les autres cas, on fabrique une petite boîte en carton de forme rectangulaire, comme nous l'indiquerons plus loin; on y verse une couche de paraffine, qu'on laisse se solidifier. On y oriente encore l'objet; on le recouvre de paraffine liquide à 56°; puis on laisse refroidir. On enlève le carton formant la boîte pour éviter l'écrasement; on

entoure le bloc de paraffine d'un tour de papier un peu épais (papier-filtre). On taille la masse d'inclusion en cône autour de l'objet, en y laissant un léger rebord (1 à 2 millimètres). On fixe dans la pince du microtome ou on coupe à main levée. On coupe en plaçant le rasoir en travers sur le microtome. Les coupes sont placées sur le porte-objet; la paraffine est dissoute par la térébenthine ou l'essence de pétrole. Le couvre-objet, enduit de baume liquide, est ensuite déposé sur la préparation.

Si l'on veut des séries de coupes, on procédera suivant les excellentes méthodes de R. Threlfall et Schällibaum que nous décrirons plus loin.

Telles sont, en résumé, les opérations pour l'inclusion dans la paraffine. Voici la marche des opérations :

TABLEAU VII.

INCLUSION DANS LA PARAFFINE. — MARCHE DES OPÉRATIONS.

A. — Fixation des éléments histologiques par l'un ou l'autre des réactifs.	*a)* Acide osmique $^1/_{100}$ à $^1/_{1000}$. *b)* — chromique $^1/_{100}$ à $^1/_{1000}$. *c)* Liquide de Kleinenberg. *d)* Chlorure mercurique, solution saturée, froide ou bouillante.
B. — Durcissement lent, en passant *successivement* dans	*a)* Alcool à 45 %. *b)* — à 65 %. *c)* — à 90 %. *d)* — à 100 %.
C. — Colorer par l'un ou l'autre réactif ci-contre.	*a)* Carmin picrique. *b)* — borique. *c)* — boracique. *d)* Acide carminique. *e)* — aluné. *f)* D'autres colorations peuvent aussi être employées.
D. — Traiter *successivement* par	*a)* Alcool à 45 %. *b)* — à 65 %. *c)* — à 90 %. *d)* — à 100 %.

E¹. — *Pour les objets volumineux et peu susceptibles de s'altérer :*
a) Térébenthine 1 + 3 alcool à 100 °/₀.
b) Térébenthine 1 + 1 alcool à 100 °/₀.
c) Térébenthine 2 + 1 alcool à 100 °/₀.
d) Térébenthine.

E². — *Pour les petits objets :*
a) Placer le spécimen dans un petit tube contenant de l'alcool à 100 °/₀; ajouter du chloroforme à l'aide d'une pipette plongeant jusqu'au fond du récipient; entre les deux couches de liquide, l'objet flotte.
b) Chloroforme pur.

F¹. — Térébenthine + paraffine (température environ 30°).

F². — Paraffine + chloroforme (température 30°).

G. — Paraffine tenue liquide entre 56 et 60° en chauffant au bain-marie.

H. — Orientation de l'objet à couper dans des cadres ou boîtes en papier où l'on aura, au préalable, versé de la paraffine qui se solidifie déjà; recouvrir l'objet de paraffine liquide.

I. — Laisser refroidir et solidifier convenablement; on peut même placer le bloc dans l'eau froide pour hâter, si c'est nécessaire, la solidification. — Coupes à main libre ou au microtome.

J. — Sériation des coupes : la lamelle est recouverte du liquide a^1 ou a^2.

a^1) Liquide de Schällibaum :
1 partie de collodion.
4 — essence de girofle.

a^2) Liquide de Threlfall : solution de caoutchouc dans la benzine.

K. — Ranger les coupes.

L¹. — Chauffer vers 60° dans une étuve pendant 10 à 15 m.; moins encore si le collodion employé est dense.

M¹. — Enlever la paraffine à l'aide de la térébenthine.

L². — Chauffer vers 60° pour que les coupes s'affaissant s'introduisent dans la mince couche de caoutchouc.

M². — Enlever la paraffine par l'essence de pétrole.

N. — Une lamelle recouverte de baume dissous dans la térébenthine est placée sur les préparations.

Remarque. — Il est avantageux, dans certains cas, de ne pas colorer en masse; il suffira alors, après avoir traité suivant B, de passer immédiatement en E¹ ou E²; on continuera jusqu'en M¹ ou M²; on colorera alors. Puis on reprendra la marche des opérations, indiquée dans le tableau I, à partir de E; on pourra toujours monter dans le baume ou dans la glycérine.

Dans le tableau qui nous occupe, on pourra changer la marche des opérations à partir de M^1 ou M^2; après avoir dissous la paraffine par la térébenthine, on enlèvera ce dernier liquide par l'alcool, qui sera enfin remplacé par la glycérine.

Exercices. — 1. Nous proposons aux débutants de traiter le lombric des jardins suivant le tableau qui précède; ils choisiront un individu ayant au plus 1 à 1 1/2 millimètre de diamètre; — ils le traiteront par A*b* $^3/_{1000}$, 24 heures; — B*a*, B*b*, 6 heures; B*c*, 24 heures; — un fragment de 2 à 4 millimètres de long est préparé suivant C*a*, 24 heures; — D*a*, D*b*, 6 heures; D*c*, 24 heures; — E^1a, 6 heures; E^1b, 9 heures; E*c*, 12 heures; E^1d, 12 heures; — F^1, 12 heures; — G, 12 heures (on peut chauffer le bain-marie à l'aide d'une lampe à pétrole que l'on règlera pour avoir une température constante).

Les manipulations H, I, Ja^1, K et L^1 M^1 N se font successivement.

2e *exercice.* — Un fragment de tube digestif de la grenouille, long de 3 à 6 millimètres, est traité comme nous venons de l'indiquer.

3e *exercice.* — Un fragment de 4 à 5 millimètres carrés de la peau d'une grenouille est traité comme en A*a* $^1/_{1000}$, 10 minutes; — on diminuera le temps indiqué pour le séjour dans les liquides du quart de ce qui est renseigné dans le premier exercice.

4e *exercice.* — EMBRYONS DE POULET DE 30 A 50 HEURES ÉTUDIÉS PAR DES COUPES. — Suivre la marche du tableau I jusqu'en F^2 inclusivement; on continuera les opérations du tableau VII à partir de E^1 inclusivement. L'embryon séjour-

nera dans les différents liquides pendant le temps indiqué pour la préparation du ver de terre.

PARAFFINE.

La paraffine est une substance solide, incolore, à texture cristalline, translucide, inodore et sans saveur. Elle fond entre 43° et 65°. Elle bout vers 300°. Elle ne se dissout ni dans l'eau, ni dans l'alcool froid. Elle est soluble dans environ 3 parties d'alcool bouillant. L'éther, les huiles grasses et essentielles, les huiles provenant de la distillation de pétrole, la benzine, le chloroforme, la térébenthine, le xylol la dissolvent.

La paraffine du commerce est un mélange d'hydrocarbures saturés; voilà pourquoi son point de fusion est si variable.

Pour les inclusions, la paraffine sera choisie avec soin. Il faut qu'elle ait perdu toute odeur de pétrole. On se plaint quelquefois de ce que cette substance présente des pores nombreux, qui entravent l'inclusion; cet inconvénient provient de ce qu'elle renferme alors des substances volatiles, qui forment des bulles dans la masse quand on la chauffe. En la tenant fondue pendant un certain temps, à une température de 125 à 150°, on obtient une paraffine bien homogène. Mais cette manipulation est inutile si l'on exige du marchand une paraffine sans odeur et bien homogène.

Appareil pour filtrer la paraffine et pour obtenir cette substance à différents points de fusion.

Après avoir servi une ou deux fois, la paraffine employée pour l'inclusion des objets à débiter en coupes se trouve hors

d'usage : de la poussière et des fragments de coupes s'y trouvent en suspension et en altèrent la pureté.

Après un assez long repos à la température de fusion et par décantation, il est possible d'éloigner une partie de ces matières étrangères qui souillent la masse d'enrobage. Pour la purifier complètement, ce qui est mieux encore, c'est de la filtrer. Il suffit pour cela de la verser, alors qu'elle est liquide et à une température de 100° environ, sur un filtre en papier contenu dans un entonnoir ordinaire. Vers la fin de l'opération, la température s'abaissant, la paraffine se fige dans l'entonnoir; on est alors obligé de chauffer ce dernier. Pour éviter cet inconvénient et rendre l'opération plus

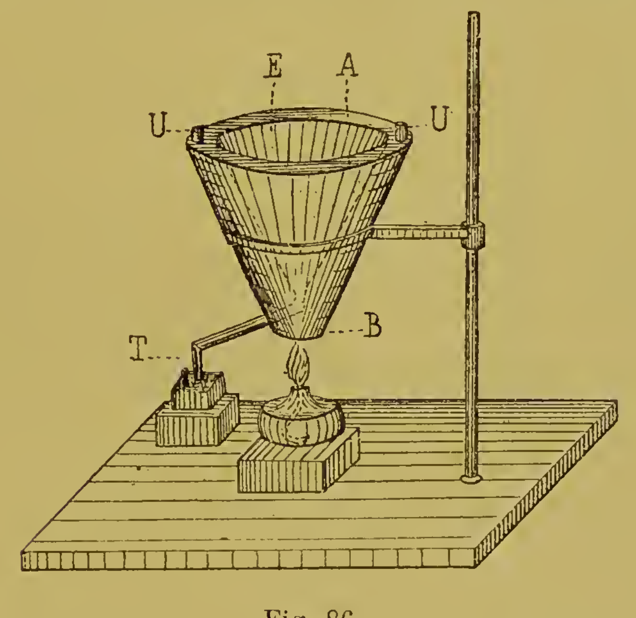


Fig. 86.

rapide, on se servira d'un entonnoir en fer-blanc à double paroi, qui peut être chauffé.

En voici la description (fig. 86) : dans la grande base A (16 centimètres de diamètre) d'un tronc de cône (hauteur

16 centimètres), se trouve soudé par le bord supérieur un entonnoir E (12 centimètres de diamètre). Ce dernier est terminé inférieurement par un tube T courbé et sortant latéralement du cône (longueur externe 4 $^1/_2$ centimètres). La petite base de celui-ci (5 $^1/_2$ centimètres de diamètre) peut être chauffée. L'espace compris entre la paroi du cône et l'entonnoir est rempli d'eau. Deux tubulures U (1 centimètre de diamètre et 1 centimètre de hauteur) sont adaptées sur la base supérieure de l'appareil : l'une porte un thermomètre, l'autre sert à l'introduction de l'eau et laisserait échapper la vapeur d'eau s'il s'en formait. Un couvercle, portant également une tubulure centrale pour thermomètre, ferme l'entonnoir. Pour se servir de l'instrument, on le placera sur un support, de façon à pouvoir le chauffer par une lampe ou par un brûleur à gaz; une feuille de papier-filtre, convenablement pliée, sera déposée dans l'entonnoir. Les déchets de paraffine de toute espèce, provenant des coupes aussi bien que des blocs que l'on a taillés pour les fixer dans les pinces du microtome, sont déposés dans le filtre. On élève la température en chauffant en B. Bientôt, la paraffine entre en fusion et coule aussi rapidement à travers le papier que si c'était de l'eau; on la recueille à l'extrémité du tube T dans les boîtes à inclusion dont les parois internes sont enduites de glycérine.

L'appareil à filtrer que nous venons de décrire permet, avec la plus grande facilité, d'obtenir des paraffines à divers points de fusibilité; ceci a une grande importance, nous avons vu pourquoi antérieurement. Voici comment on procédera : on choisit une qualité de paraffine qui deviendra liquide entre 40 à 45°. On la coupe en petits fragments que

l'on dépose dans l'entonnoir muni de papier à filtrer; on élève graduellement la température; on la maintiendra à la hauteur correspondant au degré auquel on désire obtenir la fusion; le liquide qui passe à ce moment est reçu dans des boîtes qui seront étiquetées immédiatement; la solidification ne tardera pas à se produire. La fusion aura lieu à la température indiquée au moment de la filtration.

On mélangera les paraffines fondant à divers degrés pour en former des masses définitives à point de fusion convenable et qui se laisseront couper sans enroulement à une température déterminée.

L'appareil que nous venons de décrire remplacera avantageusement le bouilleur R, dont il s'est agi pour l'emploi du vide appliqué à l'inclusion dans la paraffine. A l'une des tubulures U, on fixera le tube barométrique plongeant dans le mercure; à l'autre tubulure s'appliquera le tube en verre communiquant avec le flacon où la paraffine est tenue en fusion.

Pour ramener la vapeur d'eau à l'état liquide, il suffira de verser dans l'entonnoir interne E de l'eau froide, qui s'échappera par le tube T. On aura ainsi un véritable réfrigérant.

Quand l'instrument servira de bouilleur pour faire le vide, il ne devra contenir que peu d'eau.

Au lieu de paraffine pure, certains auteurs, dans le but d'empêcher l'enroulement des coupes, ont proposé d'ajouter des substances telles que l'axonge, l'huile de pétrole, la vaseline, qui diminuent la température de fusion. Le spermaceti et la cire ont même été employés sans paraffine, en suivant une méthode identiquement la même que celle que nous venons d'étudier.

Nous allons donner les formules les plus connues :

Balfour et Forster proposent : 1° un mélange de 5 parties de paraffine solide, 1 partie d'huile de paraffine, 1 partie d'axonge.

2° La cire et l'huile, mélange obtenu en chauffant 3 parties de cire blanche ordinaire avec 1 partie d'huile d'olive.

3° Le spermaceti, obtenu en chauffant 4 parties de spermaceti avec 1 partie de beurre de cacao.

4° Quatre parties de spermaceti mélangées à une partie d'huile de ricin.

Ces moyens ne nous ont jamais donné des résultats meilleurs que la paraffine.

Frenzel a recommandé 4 parties de paraffine et 1 partie de vaseline. La présence de cette substance diminue le point de fusion et, par conséquent, empêche, dans une certaine mesure, l'enroulement des sections; par contre, il n'est pas possible d'obtenir des coupes très fines.

Non seulement il faut tenir compte de la température de la salle où l'on travaille pour choisir la paraffine, mais encore il faut savoir que pour obtenir des coupes très minces, c'est la paraffine dure et à point de fusion élevé qui servira à l'inclusion. Quand les objets sont très petits, cette dernière paraffine est employée sans inconvénient. Mais pour de très grandes coupes, on ne réussira qu'avec une paraffine moins dure. La pratique, d'ailleurs, a bien vite éclairé l'opérateur sur ce point.

Pour ce qui est d'obtenir des rubans de coupes, c'est par de la paraffine molle que la chose est possible; l'adhérence des sections est alors réalisable. S'il est nécessaire d'avoir en

même temps des coupes fines en ruban, on inclut d'abord l'objet dans une masse d'une dureté convenable; puis on fait une inclusion du tout dans une paraffine assez molle pour permettre l'adhérence des sections entre elles.

DISSOLVANT DE LA PARAFFINE.

Si le dissolvant préféré est le chloroforme, on coupera de petits fragments de paraffine que l'on dissoudra; l'objet sera transporté dans cette solution. On élèvera la température entre 30 et 40°. On agirait de même avec le xylol, la térébenthine, la benzine, etc. Le temps de séjour dans ces liquides varie entre 15 minutes et 12 heures; avec les pièces volumineuses, il faut quelquefois prolonger pendant 24 heures. Tout dépend ici du volume de la pièce et de sa résistance à la pénétration de la paraffine.

Nous avons vu antérieurement que l'on ne passait pas brusquement de l'alcool absolu dans le dissolvant pur, mais qu'il fallait ici se servir de solution de ce dernier dans l'alcool. C'est surtout important pour la térébenthine.

Pour enlever la paraffine sur le porte-objet, quand les coupes sont faites, on se sert de la térébenthine ou de l'éther de pétrole, suivant le liquide fixateur que l'on a employé. Si l'on n'a pas fixé les coupes, il est indifférent d'avoir recours à l'un ou à l'autre des deux liquides. Quand la paraffine n'est pas enlevée rapidement des coupes par le dissolvant, on chauffe légèrement à la lampe, ce qui hâte beaucoup l'opération; ceci n'est utile que dans certains cas, surtout avec les grandes sections où il peut rester, si l'on n'y prend garde, des parcelles de paraffine dans les préparations.

BAIN-MARIE POUR LA FUSION DE LA PARAFFINE.

Pour les commençants, un récipient quelconque, d'une contenance d'environ un litre et sur lequel on peut fixer une capsule pour la fusion de la paraffine, convient comme bain-marie. Par la suite, on se fera fabriquer par n'importe quel ferblantier une caisse carrée en laiton de 20 centimètres de côté et de 9 centimètres de haut. Dans la face supérieure, on ménagera : 1° deux creux dans lesquels deux capsules pénétreront exactement; 2° deux creux cylindriques où entreront deux cylindres en forme de seau; 3° un dé pour fixer un thermomètre; 4° une cheminée pour introduire l'eau dans le bain-marie et pour dégager la vapeur s'il s'en formait. Sur les faces latérales, il est utile de disposer des rainures sur lesquelles on placera les préparations à sécher. On chauffe par une petite flamme, soit d'une lampe à alcool, soit d'un bec de Bunsen, soit même à l'aide d'une petite veilleuse à l'huile grasse. Dans ce dernier cas, on fera bien d'entourer le récipient de flanelle pour éviter la déperdition de la chaleur.

On apportera, suivant les besoins, bien des modifications à l'appareil que nous venons de décrire. En augmentant les proportions, comme Andrews et Natrieb le proposent, à la face supérieure, on appliquerait des creux rectangulaires où, sur des supports convenables, les préparations seraient rangées pour évaporer l'essence de girofle ou tout autre liquide; ces supports mobiles peuvent être retirés facilement. (*Amer. Natural.*, 1885, p. 917, 3 fig., et *Journal R. M. S.*, december 1883.)

Pour transporter les objets dans les capsules ou les récipients dans lesquels la paraffine est en fusion, on se sert de

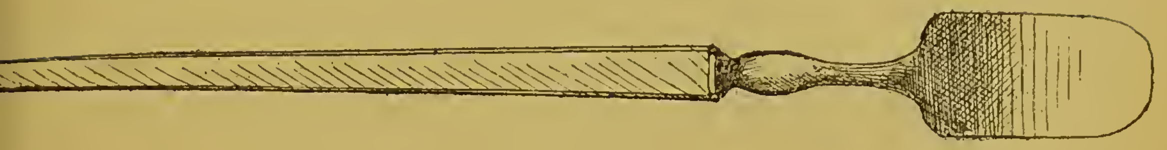


Fig. 87.

la spatule en laiton que nous avons représentée par la figure 87 (1).

MOYEN D'ACCÉLÉRER L'INCLUSION DANS LA PARAFFINE A L'AIDE DU VIDE.

Dans le *Zoologischer Anzeiger* (VII, 1884), le Dr Hoffmann a décrit et figuré un appareil permettant de produire le vide pour l'inclusion rapide des pièces dans la paraffine (fig. 88).

Une trombe T, fonctionnant par une pression d'eau, est reliée à un récipient, un excitateur E, dans lequel sont contenus l'objet et la paraffine P; celle-ci est maintenue en fusion par un bain-marie B, dans lequel l'excitateur est placé. Un thermomètre B permet d'apprécier la température. Un conduit, partie en verre, partie en caoutchouc, relie la trombe à l'excitateur. Dans ce conduit, on intercale : 1° du côté de la pompe, un flacon F, empêchant, en cas d'accident, l'eau de pénétrer jusqu'à l'excitateur; 2° un tube barométrique M, dont l'extrémité libre plonge dans un vase H*g*, contenant du mercure; il sera possible ainsi de connaître l'état du vide dans tout l'appareil, par la hauteur de la

(1) A. Garbini a fait construire des spatules semblables en gutta-percha pour manier les objets dans le chlorure mercurique.

colonne mercurielle. Un vide de 700 à 720 mm. suffit pour faire pénétrer la paraffine au bout de 30 minutes.

Pour réaliser l'appareil d'Hoffmann, il faut une trombe, et ce que l'on n'a pas partout, une pression d'eau d'une atmosphère au moins. Il est vrai qu'à l'aide d'un aspirateur très

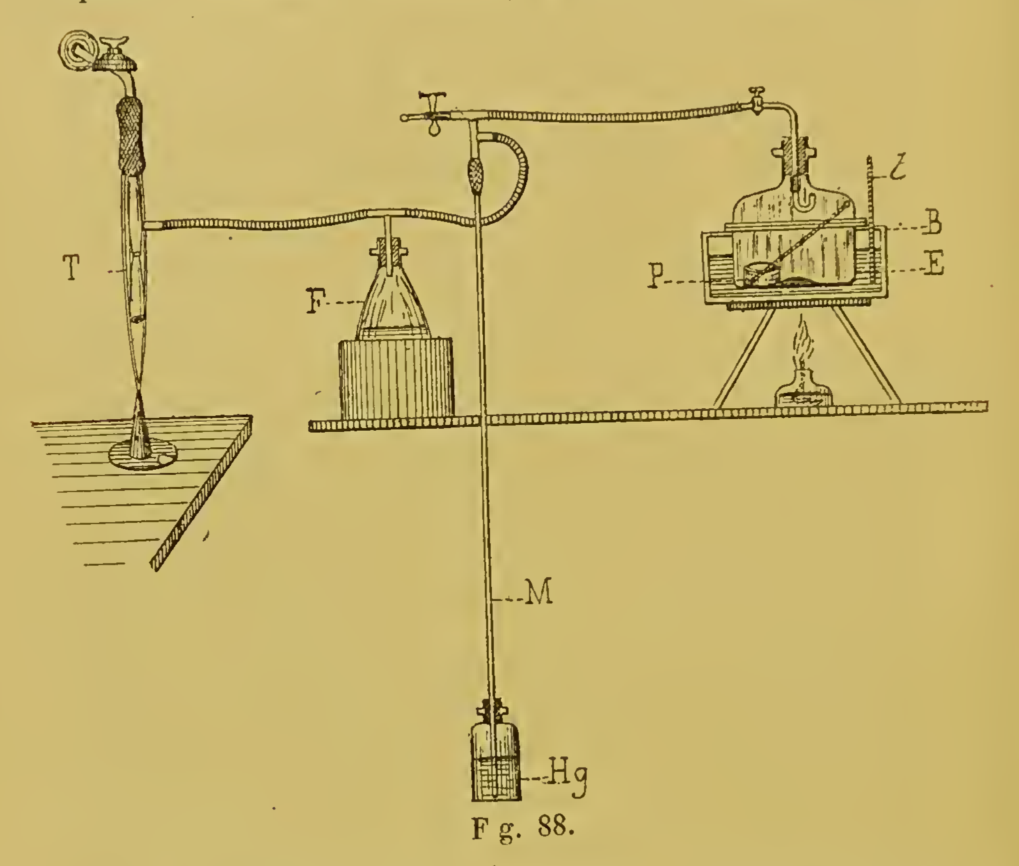


Fig. 88.

long, la pompe de Bunsen, par exemple, une pression n'est pas nécessaire; mais alors il faut travailler à l'étage. Une machine pneumatique n'est pas non plus ce qu'il y a de plus commode.

Nous croyons être utile au travailleur isolé en faisant connaître un moyen facile de produire le vide pour inclure les objets sans trombe ni machine. Depuis longtemps déjà, afin

de débarrasser les tissus végétaux de l'air qu'ils contenaient, pour assurer leur coloration par les réactifs et les enrober ensuite, nous employons le vide produit comme nous allons le décrire. Dans un ballon B (fig. 89), relié par un tube de

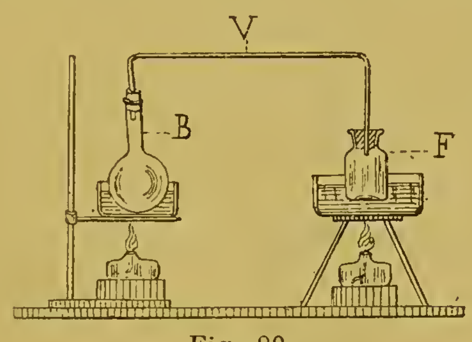


Fig. 89.

verre V au flacon F contenant l'objet avec la substance convenable, nous faisions bouillir de l'éther ; quand l'appareil était saturé de vapeur, quand il ne contenait par conséquent plus d'air, nous refroidissions le ballon très lentement.

L'éther à l'état gazeux redevenait liquide ; le vide se trouvait ainsi réalisé. On voyait alors s'échapper en grand nombre de petites bulles d'air de l'objet à préparer ; le tout restait intact pendant une demi-heure ; puis nous laissions pénétrer très lentement l'air dans le ballon par un tube de verre muni d'un fragment de caoutchouc fermé par une pince de burette. Ce moyen est très recommandable, à condition d'éloigner toute cause d'accident : les vapeurs éthérées peuvent s'enflammer si l'on ne prend pas assez de précaution. Pour produire l'ébullition, il suffit d'un bain-marie préalablement chauffé à 40°, ce qui dispense de l'emploi d'une flamme. C'est pendant que l'éther bout que le flacon F doit être débouché.

Quand nous procédions comme nous venons de l'indiquer, l'odeur pénétrante de l'éther n'était même pas perçue dans notre salle de travail.

Cependant, nous avons maintenant changé cette disposition; au lieu de faire usage de vapeurs d'éther, nous employons la vapeur d'eau. Voici comment nous opérons : un récipient B (fig. 90), en fer-blanc, d'une capacité d'un demi-

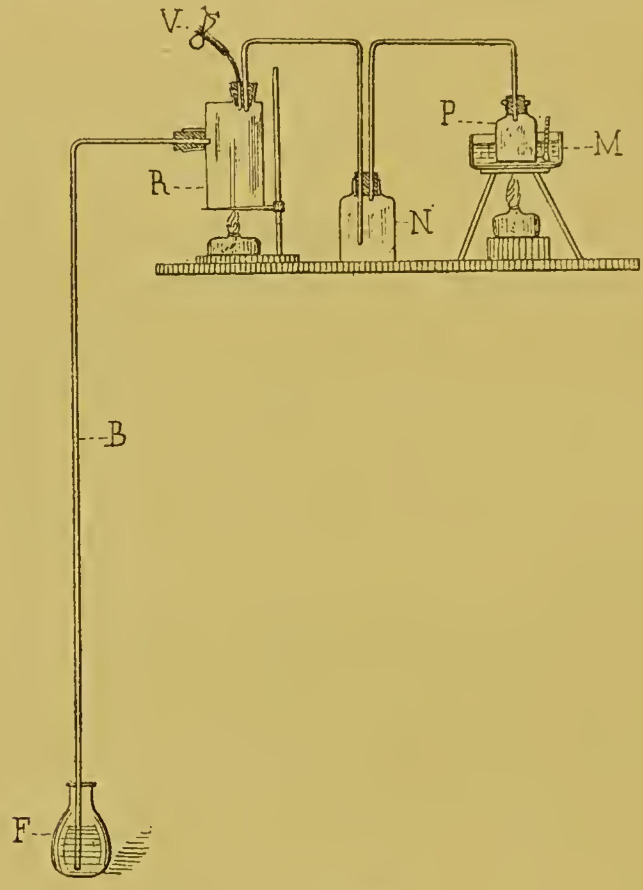


Fig. 90.

litre, est muni de deux tubulures; l'une porte un tube barométrique B, plongeant dans un flacon F, contenant du mercure; à l'autre tubulure, nous appliquons un tube de

verre communiquant avec le flacon P, où nous tenons en fusion la paraffine à l'aide d'un bain-marie M; il est utile (mais pas nécessaire) d'intercaler dans le conduit un flacon N, comme le montre le dessin; il retiendrait les vapeurs d'eau s'il s'en produisait en trop grande quantité.

L'eau est amenée à l'ébullition dans le bouilleur R par une lampe à alcool; l'air peut s'échapper par un tube muni d'une pince V; quand la vapeur s'élance en jet, nous enlevons la source de chaleur; nous fermons la pince, nous refroidissons doucement le vase en fer-blanc à l'aide d'une éponge mouillée. La vapeur d'eau redevient liquide, le vide se produit ainsi; le mercure monte dans le tube barométrique au delà de 70 centimètres; l'air est expulsé de la pièce à préparer; dans les interstices, la paraffine pénétrera facilement. Si l'on enrobe par l'intermédiaire du chloroforme ou de la térébenthine, ces substances seront plus rapidement vaporisées et, par conséquent, plus facilement enlevées du spécimen que l'on prépare. Après une demi-heure, on laissera rentrer doucement l'air dans l'appareil. On procédera ensuite comme à l'ordinaire.

Cette disposition, fort simple et peu coûteuse, sera réalisée sans difficulté par les travailleurs ou amateurs isolés; en faisant connaître ce procédé, nous avons cru rendre uniquement service aux chercheurs qui n'ont pas l'occasion de fréquenter les laboratoires officiels. Ces derniers adopteront l'appareil d'Hoffmann; nous recommandons dans ce cas l'excellente pompe de Muencke, qui donne à volonté le vide et une pression d'air; cette dernière rendra de grands services : on l'adaptera au chalumeau à gaz pour le travail du verre; on s'en servira pour saturer constamment d'air les aquariums.

BOITES ET CADRES D'INCLUSION.

On s'est servi pendant longtemps de boîtes en papier ou en carton pour inclure les objets dans la paraffine. Ce moyen, dans certains cas, pouvant encore être avantageux, nous allons faire connaître ici le moyen ingénieux décrit par le Dr Blochman pour confectionner les boîtes. Une feuille de papier rectangulaire (fig. 91), de l'épaisseur d'une carte postale, est pliée suivant aa', bb', cc', dd'. — Bc' est amené en contact avec Bb ; Ac avec Aa ; CD avec Ca' ; Dd' avec Db' ; on obtient ainsi, en amenant les rectangles Bc'Dd', CAcd, ABab et CD$a'b'$ dans une position perpendiculaire par rapport à ABCD, quatre cornes formées par BbB'c', Dd'D'b', Cd'C'a' et AA'ca ; ces cornes sont rabattues d'un côté sur ABab et de l'autre sur CD$a'b'$; on plie les bords suivant A'B' et C'D' de façon à les rabattre en dehors.

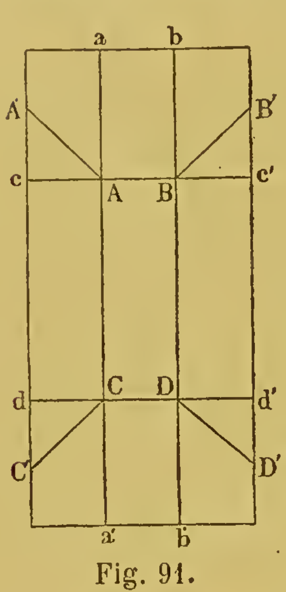


Fig. 91.

Pour les objets plats et qui doivent être rigoureusement orientés suivant une direction, quand ils sont assez volumineux, on entoure un bloc de liège, en forme de parallélépipède, d'un rebord de papier que l'on fixe à la gomme; on a ainsi une petite boîte dont l'une des faces du liège forme le fond.

Pour la rapidité du travail, les boîtes ont été remplacées par un cadre métallique composant une petite boîte sans fond ; c'est à l'Institut zoologique de Leipzig qu'on s'en est servi

pour la première fois; Andres, Giesbrecht et Mayer (1) en ont changé un peu la forme et lui ont donné l'aspect de la figure ci-contre :

Ces moules sont constitués de deux lames coudées à angles droits et dont chacune aurait pour section l'une des

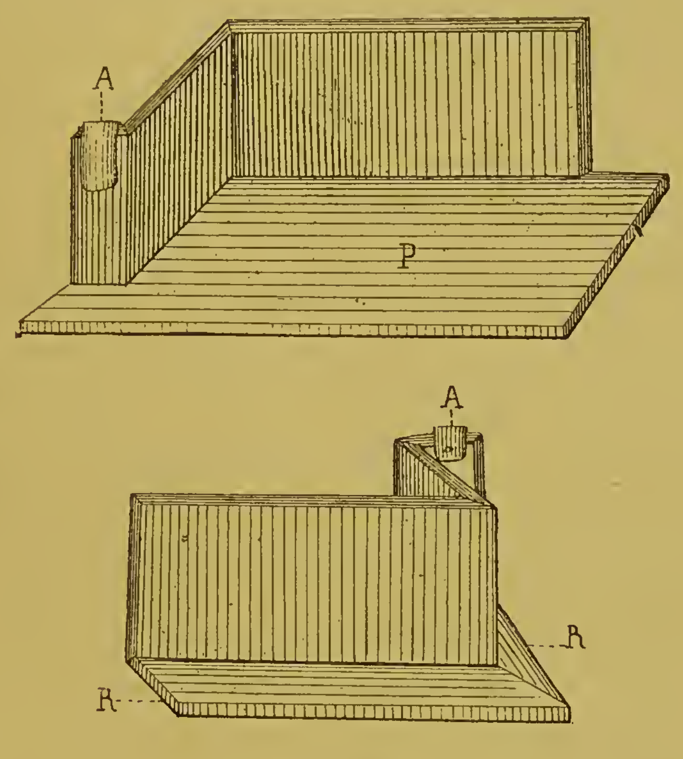


Fig. 92.

parties du dessin ci-haut représenté. Par de la glycérine, les deux moitiés sont réunies quand on veut y couler de la paraffine.

Les cadres d'inclusion dont nous nous servons diffèrent de ce qui précède en ce qu'ils sont munis d'un fond permanent (fig. 92); voici comment nous les faisons construire :

(1) Mitth. Zool, *Stat. Neapel*, IV, (1883) pp. 435-6.

deux lames de laiton (1 millimètre d'épaisseur), de 8 cent. de long et de 2 1/2 de haut, sont pliées à angle droit à 5 cent. de l'une des extrémités et à 1 cent. de l'autre extrémité, mais cette fois en sens contraire. A l'une des pièces ainsi disposées, on soude dans l'intérieur de l'angle droit avec les plus grands côtés une plaque P, de 6 cent. de long et 4 de large, pour servir de fond au cadre. A l'autre pièce de ce dernier, mais en dehors, on soude sur le bord externe deux lames de 1 cent. de large, l'une ayant 6 et l'autre 3 cent. de long. Ces deux rebords R s'appliqueront exactement sur le fond de la première pièce; en réunissant les deux parties ainsi construites, on obtient une boîte ayant un fond permanent (1). Par cette disposition, le cadre devient plus maniable; il ne sera plus nécessaire de le fixer sur une lame de verre pour lui donner un fond, et on pourra plus facilement le transporter sur le bain-marie. Avant de couler la paraffine, il faut en enduire les parois internes de glycérine.

Quoique bien des personnes ne soient pas de notre avis, nous estimons pourtant que les meilleurs instruments d'inclusion sont tout simplement des boîtes rectangulaires en fer-blanc avec fond soudé; on en aura de diverses dimensions.

Si, avant de couler la masse, on enduit avec soin de glycérine les parois internes de la boîte, la paraffine n'adhère pas; en se refroidissant, elle subit d'ailleurs un retrait très sensible; on l'enlève en bloc de la petite boîte tout aussi facilement que si on avait employé un cadre mobile.

Les boîtes que nous recommandons plutôt que les cadres sont moins coûteuses et d'un usage bien plus facile; jamais

(1) Deux agrafes A fixent les deux parties du cadre. Ces cadres se vendent chez M. Drosten, rue des Boîteux, Bruxelles.

la paraffine ne peut s'en échapper, même quand on les chauffe sur le bain-marie.

On se servira encore avantageusement de boîtes rectangulaires en métal dont le fond serait formé d'un fragment de glace transparente.

Le Dr Selenka *(Zool. Anzeig., 1885)* décrit un moyen bien facile pour fixer dans la paraffine les objets très petits dans une position bien déterminée.

Dans la paroi d'un tube de verre, il produit une dépression (un creux) vers le milieu, en chauffant une certaine surface, puis en fermant le tube d'un côté, tandis que de l'autre il aspire; à l'une des extrémités, il fixe par du caoutchouc un tube en T dont l'une des branches amène l'eau chaude, tandis que l'autre conduit de l'eau froide.

La paraffine est versée dans la dépression du tube principal. On dispose l'objet en se servant d'une lentille, tandis qu'on laisse écouler l'eau chaude à travers le tube; l'orientation obtenue, on fait traverser tout l'appareil par l'eau froide; la paraffine se solidifie immédiatement et l'objet reste dans la position qu'on lui a donnée.

Pour inclure dans les boîtes et dans les cadres que nous avons décrits ci-dessus, on commence par verser un peu de paraffine dans ces récipients, puis, quand commence la solidification, on dispose, en l'orientant convenablement, l'objet que l'on veut couper.

COUPES A LA MAIN.

Les objets, inclus par l'une ou l'autre des méthodes que nous venons de décrire, sont coupés à la main ou au micro-

tome. Quand il s'agit de la paraffine et que l'on veut couper à la main, il est avantageux d'inclure l'objet sur un fragment de bouchon, car la masse d'inclusion se ramollit rapidement entre les doigts. Il faut aussi choisir un rasoir convenable. L'une des faces doit être plane, c'est celle-là qui doit se trouver en contact avec l'objet; l'autre est évidée. Nous recommandons, pour cet usage, les rasoirs de Jacques Lecoultre aux Sentiers. Pour empêcher les coupes de rouler, on employera le petit appareil que nous décrirons plus loin et qui s'applique au dos du rasoir.

Pour couper à main libre, voici la position que nous croyons être la meilleure : l'objet est tenu dans la main gauche entre le pouce et l'index; le rasoir, là où il est adapté au manche, est pris dans la main droite entre les quatre doigts fermés; le pouce de cette main est appliqué contre l'ongle du pouce de la main gauche; on a ainsi un point d'appui pour la main droite; la main gauche est appuyée contre la table de travail. On tâche de couper ainsi, en essayant toujours d'obtenir des coupes très fines. Après un jour ou deux d'exercices, on parvient à obtenir des coupes très minces.

Pour couper dans d'autres masses d'inclusion, on procède de même.

A main libre, on n'est jamais certain d'obtenir des séries complètes de coupes. Le débutant doit cependant pouvoir employer ce moyen, et quand bien même il aurait à sa disposition un microtome, il ne négligera pas de s'exercer à couper à main libre.

DESCRIPTION DES DIFFÉRENTES MÉTHODES EMPLOYÉES POUR RANGER LES COUPES EN SÉRIES SUR LE PORTE-OBJET.

Dans un grand nombre de recherches histologiques de zoologie ou de botanique, il est indispensable, pour établir les rapports exacts entre les différentes parties de l'organisme étudié, de pouvoir disposer les coupes en séries continues. Par ce moyen, un grand nombre de questions restées obscures ou insolubles jusqu'à ce jour pourront être maintenant abordées avec succès.

Autrefois, on se trouvait dans la nécessité de mettre une tranche unique sur un porte-objet : autant de coupes, autant de préparations qu'il fallait soigner une à une. Cette manipulation était bien coûteuse et bien longue.

Pour les objets inclus dans la paraffine, Mayer, à Naples, essaya, il y a quelques années, de fixer en séries régulières des coupes sur un même porte-objet. Voici, avec quelques légères modifications, la méthode qu'il employait : à mesure qu'on obtenait de minces tranches, on les plaçait en les alignant sur le porte-objet. A la lampe à alcool, ou mieux au bain-marie, on amenait la paraffine juste à son point de fusion ; on laissait refroidir ; puis le verre-couvreur était placé ; on chauffait de nouveau un peu pour produire une légère adhérence entre les coupes et les deux verres. Ensuite, avec une extrême précaution, et en très petite quantité, on faisait arriver par capillarité de l'essence de térébenthine sous la lamelle, afin de dissoudre la paraffine. A l'aide d'un fragment de papier à filtrer, on enlevait la térébenthine, en la plaçant d'un côté du couvre-objet, tandis que de l'autre côté on déposait, pour la faire pénétrer, une

goutte de baume de Canada, rendu, au préalable, liquide par dissolution dans la térébenthine.

Quand il s'agissait de coupes de petites dimensions, le moyen que nous venons d'indiquer était long et pénible. Souvent, à la dernière phase de l'opération, alors que l'on espérait obtenir de belles séries bien disposées, tout se dérangeait tout à coup. Mais, quand la surface des tranches était assez considérable pour permettre une certaine adhérence entre celles-ci et les lamelles de verre, on réussissait presque toujours. Il est des circonstances où l'on pourrait certainement employer encore ce moyen avec succès; voilà pourquoi nous l'avons rappelé ici.

Mais c'est à Giesbrecht que revient l'honneur d'avoir découvert une méthode certaine pour arriver à ranger des séries complètes de coupes sur une même lame de verre. Voici le moyen que cet auteur a indiqué en 1881, dans le nº 92 du *Zoologischer Anzeiger*, puis, plus tard, dans les *Mittheilungen*, de Naples :

1º Faire une dissolution de gomme-laque blanche dans l'alcool absolu; filtrer, après avoir laissé déposer;

2º A l'aide de ce vernis, on enduit d'une mince couche le porte-objet;

3º L'alcool évaporé rapidement laisse une mince pellicule de gomme-laque sur le verre; on recouvre alors d'une mince couche de créosote ou d'essence de girofle. *Les coupes sont rangées à mesure qu'on les obtient* sur le porte-objet, préparé comme nous venons de l'indiquer;

4º L'essence de girofle ou la créosote est évaporée dans une étuve où l'on place les porte-objets; la température ne doit pas dépasser 60°;

5° L'essence de girofle ou la créosote étant complètement évaporée, on enlève la paraffine par l'essence de térébenthine, qui ne dissout pas la gomme-laque. On place ensuite le verre-couvreur, enduit de baume dissous dans la térébenthine.

Il ne faut souvent pas plus d'un quart d'heure pour évaporer l'essence de girofle ou la créosote, surtout quand on n'en a mis qu'une mince couche; ce qui est, d'ailleurs, indispensable, si l'on veut réussir.

Méthode pour fixer les diatomées en séries. — *Par ce moyen, nous avons pu ranger aussi des diatomées et des infusoires qui restaient parfaitement sur le porte-objet, là où nous les placions. Nous prenions soin de mettre ces organismes dans l'alcool absolu, puis nous les rangions sur le verre, d'abord enduit de gomme-laque et d'essence de girofle ou de créosote. Ces liquides étaient évaporés comme nous l'indiquons plus haut. Le verre-couvreur enduit de baume liquide était ensuite fixé.* Nous ne savons si ce moyen a déjà été signalé à l'attention des naturalistes qui s'occupent des diatomées.

Mais la méthode de Giesbrecht, quoique rendant les plus grands services, ne permettait pas de colorer les coupes sur le porte-objet, ni même de les monter dans la glycérine. Pour enlever la térébenthine, il faudrait, en effet, employer l'alcool absolu qui dissoudrait la gomme-laque; ce qui aurait nécessairement amené le dérangement de toutes les coupes.

Dans l'*Archiv für mikroskopische Anatomie*, vol. XXII, 1883, H. Schällibaum décrit une méthode plus simple que celle de Giesbrecht; elle permet d'ailleurs de colorer après avoir coupé; on peut même monter la préparation dans la glycérine, ce qui est un grand avantage en bien des cir-

constances. Par la découverte de cet excellent procédé, l'auteur a bien mérité des micrographes.

Voici cette méthode :

1° Faire une dissolution contenant 1 partie de collodion dans 3 ou 4 parties d'essence de girofle, selon que le collodion est plus ou moins épais [nous avons remplacé le collodion par le coton-poudre (1 gr.), qui se dissout dans l'essence de girofle (100 gr.)];

2° Enduire d'une mince couche de cette mixture un porte-objet; on y range les coupes à mesure qu'on les obtient ;

3° On évapore l'essence du girofle à l'étuve, à une température de 50 à 60°, ce qui demande en moyenne une à deux heures ;

4° On lave la paraffine à la térébenthine. On place convenablement le verre-couvreur enduit de baume de Canada liquide.

Quand on voudra colorer l'objet après qu'il aura été débité en coupes, on procédera comme nous venons de l'indiquer ; on enlèvera ensuite la térébenthine par l'alcool absolu; on ajoutera de l'alcool de moins en moins fort, puis on versera quelques gouttes du liquide colorant sur les coupes, on placera le tout dans la chambre humide jusqu'à coloration suffisante. On lavera ensuite à l'alcool faible, on ajoutera de la glycérine et l'on recouvrira de la lamelle. Si on voulait monter dans le baume, il faudrait laver successivement à l'alcool à 70°, 90°, 100°, puis, à la térébenthine : enfin, on placerait le couvre-objet enduit de baume comme plus haut.

Des objets inclus dans la moelle ou dans le foie pourraient également être débités en coupes, que l'on rangerait encore comme nous venons de l'indiquer, mais il faudrait pour cela qu'ils fussent imbibés d'alcool absolu.

Par la belle méthode de Schällibaum, que nous venons de décrire, *il est encore possible de ranger les diatomées en séries; nous estimons, pour le peu que nous nous sommes occupé de cet exercice, qu'on parviendrait, après quelque temps, à produire des séries de diatomées tout aussi bien que le fait Möller.*

Dans le *Zoologischer Anzeiger*, n° 140 (1883), R. Threlfall a décrit une méthode qui offre dans bien des cas de grands avantages sur celles que nous venons de décrire, surtout quand il s'agit de coupes d'un diamètre supérieur à 1 millimètre. Pour les coupes des petites dimensions, on aura toujours recours *au procédé* de Schällibaum. Il en est encore ainsi quand on voudra colorer sur le porte-objet.

Méthode de Threlfall. — 1° On fait une faible dissolution de caoutchouc dans la benzine; on l'étend sur le porte-objet comme le collodion sur une plaque photographique. La benzine s'évapore rapidement, laissant sur la lame une mince couche de caoutchouc. Les coupes, ordinairement incluses dans la paraffine, y sont rangées en série.

Quel est le caoutchouc qu'il convient de choisir? Le caoutchouc brut, autant que possible. Si l'on ne pouvait s'en procurer, on emploierait des rognures de caoutchouc ordinaire qui n'aurait pas encore été vulcanisé ou carbonisé; dans ce dernier cas, il ne serait, d'ailleurs, pas soluble dans la benzine.

Voici comment nous avons obtenu une solution convenable. Nous avons dissous d'abord assez de caoutchouc dans la benzine pour avoir une masse gélatiniforme; nous en avons pris un fragment, gros comme deux fois le volume d'un pois, que nous avons dissous dans 30 centimètres cubes de benzine; la solution a été ainsi suffisamment étendue.

2° Les coupes rangées, on chauffe légèrement à la lampe, ou mieux, au bain-marie, à une température de 56 à 60°. Les coupes, s'affaissant, sont fixées intimement au mince enduit de caoutchouc rendu fluide, dans lequel elles s'introduisent.

3° On lave la paraffine par *l'essence ou l'éther de pétrole*, qui la dissout.

4° Si la pièce a été colorée en masse, il suffit d'appliquer le couvre-objet enduit de baume liquide.

5° Si l'objet n'a pas subi l'action des réactifs colorants, on enlèvera, comme à l'ordinaire, la paraffine, par l'essence de pétrole, puis ce liquide par l'alcool absolu. On ajoutera de l'alcool de moins en moins fort; on colorera à l'aide de quelques gouttes d'un réactif convenable que l'on déposera sur le porte-objet ; on placera dans la chambre humide. La coloration obtenue, on remplacera le dernier liquide employé par la glycérine; on en enduira une mince lamelle que l'on placera sur les coupes.

Quand on voudra monter dans le baume, on arrivera successivement à l'alcool absolu; on lavera ce dernier à l'éther de pétrole, puis on fixera le verre-couvreur enduit au préalable de baume liquide.

Fixation des diatomées en séries. — Par la méthode de Threlfall, nous avons pu ranger les diatomées en séries. La solution de caoutchouc étant versée sur le porte-objet, la benzine évaporée, les diatomées sont rangées d'une façon convenable; on chauffe légèrement; les diatomées s'introduisent dans la couche de caoutchouc et elles y restent définitivement fixées; il suffit de recouvrir d'une lamelle enduite de baume.

Cette méthode a sur celle de Schällibaum de grands avantages :

1° Il ne faut plus passer les préparations à l'étuve; elles peuvent être ainsi terminées immédiatement.

2° Il est plus facile de ranger les coupes et diatomées en séries sur une surface complètement sèche.

3° L'essence de pétrole ou éther de pétrole dissout plus rapidement et plus complètement la paraffine.

Cependant, il est difficile de colorer sur le porte-objet en fixant par le caoutchouc.

Méthode de Flögel. — Une méthode fort simple, décrite par Flögel, peut également rendre des services pour ranger en séries des sections obtenues à l'aide d'objets inclus dans la paraffine.

Voici ce procédé : on dissout 5 grammes de gomme arabique dans 100 grammes d'eau. Sur la surface entière d'un porte-objet parfaitement nettoyé, on verse cette solution; on laisse écouler l'excès du liquide en tenant la lame de verre dans une position verticale.

L'opération peut ensuite être conduite de deux manières :

1° Sur la surface complètement sèche, on range les coupes; puis, en projetant l'haleine, on produit une buée qui dissout la mince couche de gomme; dans celle-ci, les sections s'introduisent; on laisse de nouveau sécher; ce qui a lieu rapidement d'ailleurs.

On enlève la paraffine en la dissolvant par la benzine; on place le couvre-objet enduit de baume, comme il a été indiqué plus haut pour les autres méthodes.

2° Les coupes sont rangées sur la plaque encore humide où elles adhèrent à mesure que l'eau s'évapore; la dessiccation

étant complète, on termine comme dans le premier cas.

S'il s'agit de coupes minces et délicates, on choisira le premier de ces moyens. Pour fixer des sections de dimensions considérables et un peu épaisses, on employera le second moyen.

Au lieu de la gomme, employée par Flögel, nous avons fait usage de la colle-forte et de la gélatine par la méthode qui suit; elle nous a donné surtout de bons résultats pour le montage dans la glycérine et quand il s'agit de couper autrement que par l'inclusion dans la paraffine :

1° On dissout à chaud 7 à 10 grammes de colle forte dans 100 grammes d'eau. (La gélatine donne également de bons résultats.) On obtient un liquide légèrement jaunâtre, qui reste parfaitement limpide par le refroidissement; on filtre ensuite.

2° Sur le porte-objet, on étend cette dissolution comme le collodion sur une plaque, ou bien encore on en étale une mince couche à l'aide d'un pinceau; on dispose les coupes sur le verre encore humide. On laisse sécher à l'abri de la poussière. Pour activer l'évaporation, les préparations peuvent être placées sur un bain-marie ou mieux encore dans une étuve (température 35° à 40°).

3° La dessiccation étant complète, on chauffe légèrement à la lampe ; la paraffine est enlevée par la térébenthine.

4° On applique le verre-couvreur enduit de baume liquide.

Remarque. — La térébenthine serait lavée par l'alcool absolu, puis la lamelle enduite de glycérine serait fixée si l'on désirait conserver la préparation par ce dernier réactif. Quand l'objet n'aura pas été teint au préalable, on colorera très bien les coupes fixées par un réactif — hématoxyline,

éosine, couleurs d'aniline, etc. — en dissolution dans l'alcool; en effet, ce dernier liquide ne dissout ni la colle-forte, ni la gélatine. En solution aqueuse, il ne serait pas possible d'employer un réactif colorant à moins qu'on ne lavât, au préalable, les coupes par l'acide tannique; ce qui compliquerait désavantageusement le procédé.

La méthode que nous venons de décrire nous semble recommandable par la facilité avec laquelle on peut obtenir le liquide fixateur; les coupes adhèrent toujours parfaitement; aucun déplacement n'est à craindre; dans les lavages, on peut faire emploi de l'éther, du chloroforme, de l'essence de girofle; on peut monter dans le baume, la glycérine ou tout autre réactif. Les plis qui se produiraient en coupant s'effacent sans difficulté. Les coupes obtenues par l'inclusion dans la gomme, l'albumine, le savon, la celloïdine peuvent aussi être rangées par le moyen qui précède. Pour cela, au préalable, on les passera à l'eau distillée; on les rangera sur la lame encore humectée par la dissolution de colle-forte; on évaporera pour éviter la déformation des tissus, seulement jusqu'à commencement de dessiccation. On traitera par l'alcool fort; ce réactif précipitant la colle produira une adhérence parfaite entre les coupes et le verre.

Méthode de Frenzel *(Zoolog. Anzeiger*, n° 130, 1883). — Le Dr Frenzel dissout le gutta-percha dans le chloroforme ou la benzine; il filtre la solution jusqu'à ce qu'elle soit claire et presque sans couleur. Celle-ci ne doit pas être trop épaisse, afin de couler facilement sur le porte-objet; on l'applique sur ce dernier en y déposant, à l'aide d'un pinceau, une goutte vers le milieu. Quand le dissolvant est évaporé, on place les coupes.

1. Si les préparations proviennent d'une inclusion dans la paraffine, on laisse tomber goutte à goutte sur les sections de l'alcool absolu pour dérouler les coupes et les aplatir; on expose ensuite le tout à une température de 35° à 50° pendant quelques minutes, afin que le gutta-percha devienne visqueux. On laisse la préparation à l'air pendant 5 à 10 minutes, puis on la dépose dans un vase contenant de l'alcool absolu porté à une température de 40° à 50° pour dissoudre la paraffine; celle-ci est enlevée en 5 à 15 minutes. L'alcool qui a été ainsi saturé de paraffine dépose cette substance par le refroidissement; il suffit de filtrer pour qu'il serve de nouveau. On soumet les coupes à l'alcool à 70°, puis on colore par une solution aqueuse ou alcoolique. Pour monter dans le baume, il va sans dire qu'il faut déshydrater et éclaircir par l'essence de girofle.

2. Si l'on a inclu dans la celloïdine, on recouvre encore un porte-objet de la solution de gutta-percha. Les coupes y sont rangées; on les humecte par quelques gouttes de chloroforme ou de benzine qui ramollit le gutta-percha. On obtient ainsi la fixation des sections. Quand ces dernières sont sèches, on colore, on déshydrate par l'alcool absolu; on clarifie par l'essence de girofle ou mieux d'origan ou de bergamote.

Frenzel, comparant la méthode dont il est l'inventeur avec celle de Threlfall *(Zoolog. Anzeiger,* p. 422, 1883), pense que par le gutta-percha l'adhérence se fait mieux : cette dernière substance résistant mieux aux dissolvants que le caoutchouc. Après que les sections ont été rangées sur la lame et que, par une température de 50° à 55° pendant quelques minutes, on a obtenu une adhérence convenable,

on verse, après refroidissement, une quantité suffisante d'éther de pétrole. On dissout ainsi la paraffine. On laisse dessécher, puis on lave à l'alcool absolu; on colore, etc. Telles sont les modifications que Frenzel a apportées à sa méthode après que Threlfall eût fait connaître son procédé.

Nous aurions pu nous dispenser de parler de la méthode de Frenzel, qui ressemble à celle de Threlfall; mais voici ce qui nous a porté à la faire connaître : *Frenzel dissout la paraffine par l'alcool absolu dans le procédé tel qu'il l'a fait connaître primitivement : en nous servant de ce moyen et en employant, pour dissoudre la paraffine, de l'alcool absolu contenant de l'acide carminique, nous sommes parvenu à colorer les coupes en même temps que nous dissolvions la paraffine.*

Il est vrai qu'en mélangeant à l'éther de pétrole, qui nous sert à dissoudre la paraffine par le procédé Threlfall, de l'alcool absolu contenant un peu d'acide carminique, nous avons également obtenu des colorations assez satisfaisantes pour que nous encouragions les chercheurs à établir des essais afin d'arriver à colorer en même temps que l'on dissout la paraffine. Il suffit pour cela de trouver des réactifs colorants solubles dans la térébenthine ou l'essence de pétrole.

Procédé du Dr Leboucq *(Société de Médecine de Gand*, 1884). — Le Dr Leboucq combine les méthodes de Giesbrecht et de Schällibaum. Voici comment : le porte-objet légèrement chauffé est enduit, au moyen d'une baguette de verre, d'une mince couche de gomme-laque en solution dans l'alcool absolu. On recouvre la gomme-laque du mélange de Schällibaum. Les coupes étant disposées en séries, on chauffe le tout à la lampe. La paraffine fondue, on verse la téré-

benthine. Il n'est même pas nécessaire d'attendre que la paraffine se refroidisse de nouveau pour pouvoir l'enlever à la térébenthine. On recouvre ensuite d'une lamelle enduite de baume.

Le Dr P. Mayer *(Mittheilungen Zool. Station zu Neapel, Bd IV)* a imaginé un moyen de fixer les coupes qui mérite également d'être connu. L'albumine d'un œuf frais est jetée sur un filtre humecté d'eau. On ajoute un peu de salicylate de soude pour éviter la putréfaction. On recouvre le tout; à l'albumine filtrée (ce qui a lieu en quelques heures), on ajoute un volume de glycérine. La solution s'applique sur le porte-objet à l'aide d'un pinceau bien propre; on en étend une couche bien uniformément. On dispose les coupes. On chauffe doucement, d'abord pour coaguler l'albumine, puis plus fortement pour fondre la paraffine. En chauffant brusquement, la paraffine pourrait fondre avant la coagulation de l'albumine; il y aurait alors des déplacements fâcheux. Après refroidissement, on dissout la paraffine par la térébenthine. On lave à l'alcool absolu. On colore comme on le désire, puis on monte dans le baume, la glycérine, etc., par les moyens que nous avons déjà indiqués à plusieurs reprises.

Autre méthode de Frenzel. Dans *l'Américan Naturalist* (1885), le Dr Frenzel propose le moyen suivant que nous avons essayé, et que nous trouvons recommandable. On fait une faible dissolution de gomme arabique dans l'eau. On ajoute une solution aqueuse d'*alun de chrome*, puis on additionne d'un peu de glycérine pour éviter la dessiccation trop rapide.

Le porte-objet est enduit avec un pinceau de la mixture précédente. Les coupes sont rangées. Le porte-objet est

alors porté sur un bain-marie pendant quelques minutes (15 au plus). La gomme est coagulée et rendue ainsi insoluble. La paraffine est enlevée par les moyens ordinaires. On colore les sections si on le désire. La fuschine et la safranine sont les seules couleurs d'aniline qui ne peuvent être employées, parce qu'elles teignent les minces couches de gomme et détruisent ainsi la préparation.

MICROTOMES.

Les instruments à l'aide desquels on peut facilement débiter les objets en coupes minces et régulières sont très nombreux. Ils se rapportent à deux types; dans l'un, l'objet est élevé verticalement par une vis micrométrique; dans l'autre, l'objet monte sur un plan incliné; l'une et l'autre formes présentent des inconvénients et des avantages.

Le microtome le plus simple est celui de Ranvier. Il est formé d'un cylindre surmonté d'un plateau. L'objet est fixé dans le creux du cylindre et élevé à chaque coupe par une vis micrométrique placée inférieurement. Le plateau sert de guide au rasoir; on y fait glisser ce dernier en l'appliquant parfaitement sur la surface supérieure.

Dans le microtome de Ranvier comme dans les anciens instruments, ce qui empêche d'obtenir des coupes fines et bien régulières, c'est la grande surface de frottement des différentes pièces. Le rasoir passant sur la table du microtome de Ranvier n'accomplit pas un mouvement suivant un plan unique. Pour éviter cet inconvénient, nous fixons, à l'aide de la gomme laque ou de toute autre substance, deux lames de verre de $^1/_2$ centimètre de large et ayant toutes

deux exactement la même hauteur : elles seront placées en travers de chaque côté de l'ouverture. Pour les essais auxquels nous nous sommes livré, nous les avons taillées dans des porte-objets.

Ces lames serviront de glissières au rasoir. Les surfaces de friction étant diminuées, le couteau glissera plus régulièrement, et, par conséquent, on obtiendra ainsi des coupes bien parallèles. En appliquant au dos du rasoir un petit appareil en fil de fer que nous décrirons, on empêchera les coupes de s'enrouler. N'importe quel rasoir sera employé, pourvu que l'une des faces soit bien plane.

Une disposition qui donne de meilleurs résultats encore consiste à fixer en travers, par la gomme laque, à la face bien plane d'un rasoir, et à une distance convenable l'une de l'autre, deux petites lames de verre un peu moins longues que la largeur du rasoir; de cette façon, elles n'arriveront pas jusqu'au tranchant; elles auront $^1/_2$ centimètre de large (ou moins encore) et une hauteur de 1 millimètre. Nous les avons encore découpées, pour les nombreuses expériences d'essais que nous avons faites, dans des porte-objets.

Les deux petits socles ainsi réalisés servent de patins au rasoir; ce dernier ne glisse plus directement sur des surfaces; il en résulte que le tranchant ne s'altérera plus aussi facilement qu'autrefois. Les surfaces de frottement étant diminuées, la course du rasoir sera régulière; on obtiendra ainsi des coupes parallèles et aussi minces que le permettra la vis micrométrique.

L'appareil pour empêcher les coupes de rouler, qui ne pouvait s'employer autrefois avec le microtome de Ranvier,

se fixera encore mieux que dans la disposition précédente.

On réalisera soi-même l'un ou l'autre des arrangements qui précèdent, en ayant soin de produire une adhérence parfaite des lames de verre contre le rasoir ou contre le microtome. Il est évident que le verre serait avantageusement remplacé par du métal; mais alors il faudrait recourir à un constructeur.

Nous avons fait construire un microtome très simple et peu coûteux et qui, pour la forme, ressemble à celui de Ranvier. Nous en avons donné, au mois de décembre 1884, une courte description, dans les Bulletins de la Société belge de microscopie. Les mouvements anormaux dus au frottement de surfaces qui ne sont pas exactement planes sont supprimés. Le rasoir est, en outre, mobile suivant une direction invariable. Voici comment ces résultats sont obtenus : deux barres prismatiques, en forme de couteau de balance, sont fixées aux deux côtés de l'ouverture du microtome; elles remplissent le rôle de rails, car elles servent de glissières au rasoir; à ce dernier est attaché, par deux vis, un petit chariot qui ne présente inférieurement que deux petits socles correspondant aux glissières et qui sont reliés par une pièce passant au-dessus du dos du rasoir. De cette façon, l'objet n'est pas en contact avec le chariot. Les deux socles possèdent chacun une rainure correspondant aux barres prismatiques dans lesquelles elle peut s'emboîter exactement. Le frottement, par cette disposition, est réduit à sa plus simple expression; quant au mouvement du rasoir, il a lieu suivant un plan uniforme; la régularité est ainsi obtenue la plus grande que possible.

Un microtome à main, construit par Reichert, est repré-

senté par les figures 93 et 94 ; il permet de couper les objets

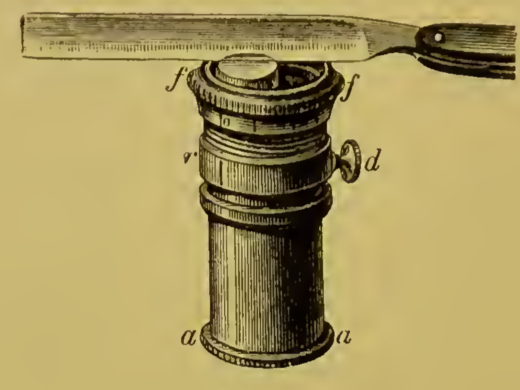


Fig. 93.

inclus dans la paraffine ou dans les autres masses d'enrobage. Il est formé d'un anneau *ff* muni d'un pas de vis fin, qui sert en quelque sorte d'écrou à un autre pas de vis porté par un cylindre formant le corps principal de l'instrument.

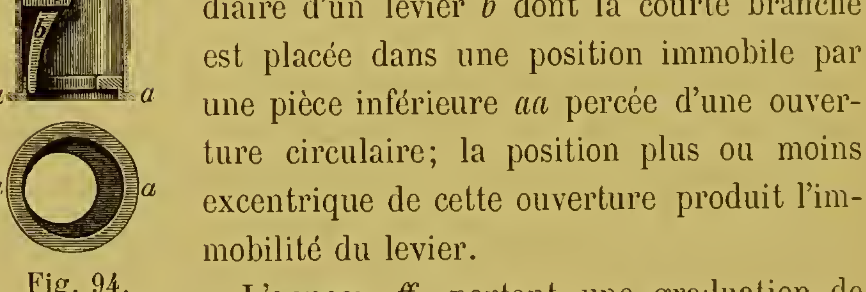


Fig. 94.

L'objet *c* (fig. 94) se fixe par l'intermédiaire d'un levier *b* dont la courte branche est placée dans une position immobile par une pièce inférieure *aa* percée d'une ouverture circulaire; la position plus ou moins excentrique de cette ouverture produit l'immobilité du levier.

L'anneau *ff*, portant une graduation de 1 à 10, étant fixe, si l'on fait tourner le cylindre d'une façon convenable, la pièce à couper s'élève en même temps que celui-ci.

Un rasoir ayant une face bien plane est nécessaire pour faire des coupes; on l'appuie convenablement contre l'anneau *ff* en le faisant de façon à atteindre l'objet à débiter en coupes.

Ce microtome est meilleur que celui de Ranvier, parce que les surfaces de frottement sont réduites.

MICROTOMES A GLISSEMENTS ET A PLAN INCLINÉ.

C'est à Rivet que revient l'honneur de l'invention de ces microtomes, qui, perfectionnés par Thoma, rendent actuellement tant de services à la science.

Ces instruments sont essentiellement formés d'un support muni de deux plans; ceux-ci sont inclinés symétriquement par rapport au plan perpendiculaire qui passe par la ligne médiane du support. L'un des plans, incliné, en outre, sur l'horizontale, porte le chariot où l'on adapte, à l'aide d'une pince, l'objet à couper; celui-ci sera donc successivement élevé d'une certaine hauteur quand le chariot avancera d'un certain nombre de divisions, indiquées par une règle graduée appliquée sur le support. Un vernier, gravé sur le *chariot porte-objet*, permet d'apprécier les fractions de divisions.

Le microtome primitif de Rivet étant en bois (1), les surfaces de glissement n'étaient, par conséquent, pas suffisamment planes pour donner des mouvements réguliers aux deux chariots. C'est bien de Rivet qu'on peut dire qu'il a su vaincre, mais qu'il n'a pas profité de la victoire. L'instrument qui nous occupe actuellement et ainsi construit ne pouvait être que d'une utilité restreinte.

Le Dr Long, de Breslau, fit monter l'appareil en laiton sans rien changer au modèle de Rivet. C'était là un progrès,

(1) Cet instrument fut d'abord construit par Verick, rue de la Parcheminerie, 2, à Paris.

car il était alors possible d'arriver à de belles séries de coupes très minces. Mais, sans qu'on pût le prévoir, il arrivait de temps à autre que l'instrument marchait d'une façon tout à fait irrégulière. On obtenait des tranches épaisses, ou bien on n'en obtenait pas du tout, en faisant avancer le chariot du nombre convenable de divisions. Cependant, de tous les microtomes connus, celui de Long était encore le plus parfait.

D'où provenait cette grave imperfection? — Les deux chariots, en glissant, appliqués par des surfaces planes adhérentes aux deux surfaces de même nature du support, produisaient ces irrégularités du mouvement : il est, en effet, impossible d'obtenir des surfaces exactement planes, de

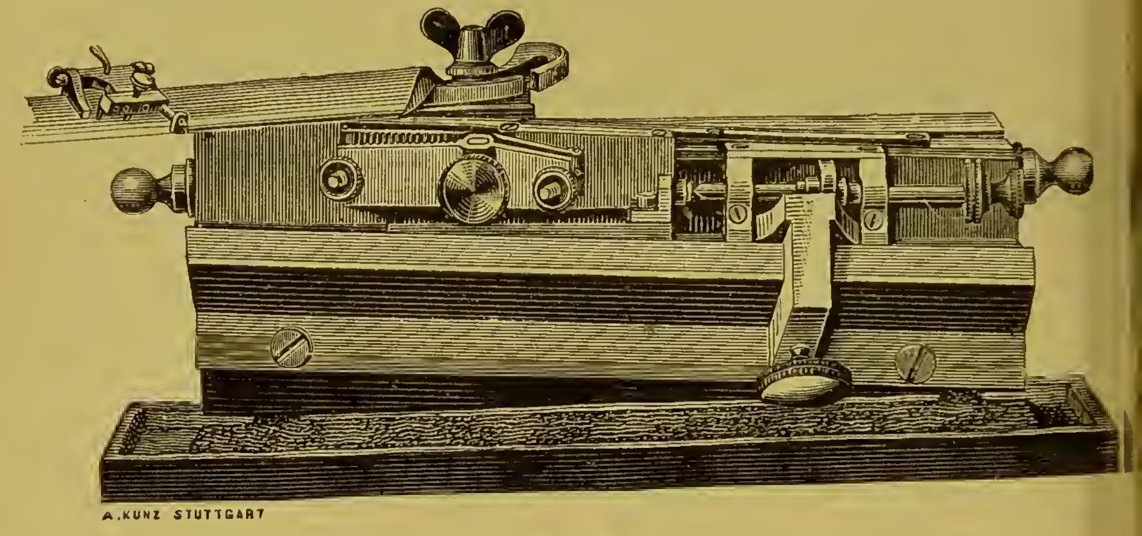


Fig. 95.

façon que le *chariot porte-rasoir* accomplisse toujours la même course. Quels étaient les moyens à employer pour obvier à ces inconvénients? Le professeur Thoma a résolu ce problème en faisant mouvoir les chariots sur cinq points

entre deux surfaces planes; le *chariot porte-rasoir* parcourt ainsi toujours le même chemin; l'autre chariot, d'ailleurs, avançant plus régulièrement, on obtient des séries de coupes parfaitement parallèles à mesure que l'objet est successivement élevé.

C'est Jung, d'Heidelberg, qui a réalisé les idées de Thoma en construisant trois modèles de dimensions différentes (fig. 95).

Stiasnie, à Paris, successeur de Verick, construit égale-

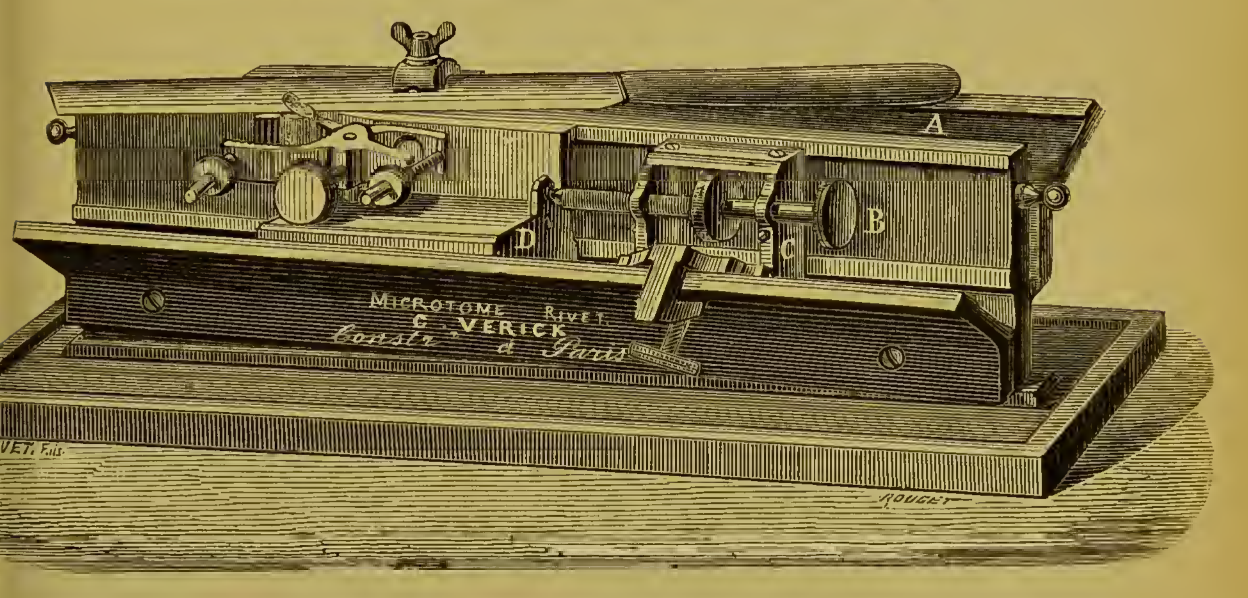


Fig. 96.

ment le même microtome avec quelques détails particuliers réalisés par ce constructeur (fig. 96).

Vis micrométrique. — L'application au microtome de Thoma d'une vis micrométrique permettant de mouvoir le *chariot porte-objet* doit être regardée comme un grand progrès. Sans doute, à l'aide du vernier de ce chariot et de la règle graduée du support, on peut avancer régulièrement

l'objet sur le plan incliné; mais la vue se fatigue rapidement à consulter constamment la graduation, et des erreurs se commettent facilement. Enfin, la vis micrométrique assure mieux la stabilité du chariot.

La vis micrométrique tourne dans les deux branches d'un cadre solidement adapté au support par une vis de pression; le cadre peut glisser sur le plan incliné comme un chariot; la pointe de la vis vient s'appliquer contre une plaque d'agate polie fixée au *chariot porte-objet*. Un tambour, portant à la périphérie 15 divisions, est fixé à la vis micrométrique et tourne avec cette dernière. Chacune de ces divisions correspond à une épaisseur de coupe de $0^{mm},001$.

La vis micrométrique a été perfectionnée. A l'aide d'un mécanisme appliqué au tambour, il n'est plus nécessaire, à chaque coupe, de consulter la graduation; le bruit d'un ressort faisant arrêt annonce à l'oreille le nombre de divisions; on peut, d'ailleurs, obtenir que le signal ne se fasse entendre qu'après 5,7 $^{1}/_{2}$ ou 15 divisions. Si l'on désire que la vis marche sans enregistrer ainsi, il suffit de changer la position d'un levier.

Stiasnie a aussi imaginé un mécanisme pour annoncer les divisions; il est plus simple que le précédent et il donne à peu près les mêmes effets.

Épaisseur des coupes. — L'inclinaison du plan du *chariot porte-objet* étant de 1 : 20 sur l'horizontale, il en résulte qu'en faisant avancer l'objet de 1 mm. sur le plan incliné, on obtiendra une épaisseur de coupe de 0,05; en avançant le vernier d'un trait, on aura 0,005 mm., ou $^{1}/_{200}$ mm.; de deux traits, $^{1}/_{100}$ mm.; de trois traits, $^{1}/_{67}$; de quatre traits $^{1}/_{50}$.

En tournant une fois le tambour gradué, les coupes mesurent 0,015 mm. de hauteur.

Pinces. — Jung construit différentes pinces pour fixer

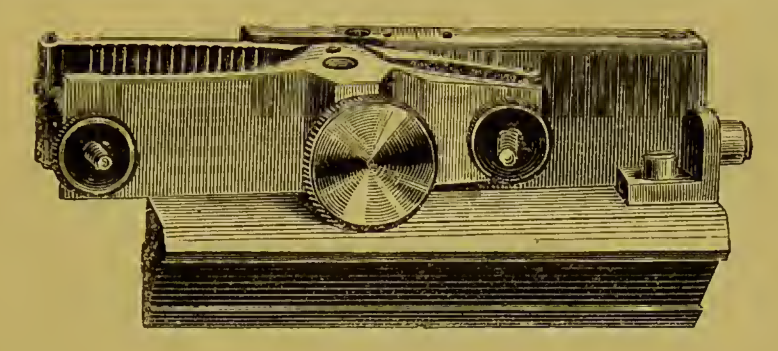


Fig. 97.

les objets; l'ancienne *pince-étau* de Rivet est très simple; l'examen de la figure 97 la fera suffisamment connaître.

La pince adoptée à la Station de Naples (fig. 98) est

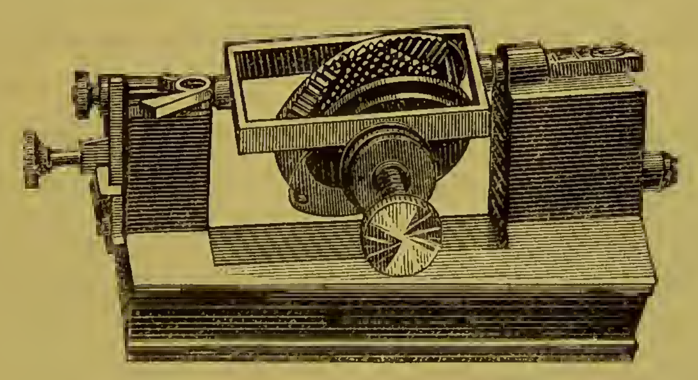


Fig. 98.

formée d'un cadre mobile sur un axe. Dans le cadre-support il s'en trouve un second, se mouvant suivant un autre axe perpendiculaire au premier; un certain mouvement d'élévation est également possible; une vis de pression fixe ce dernier cadre dans le premier; une seconde vis de pression, traversant l'axe de la première vis, fait mouvoir une plaque

dentelée mobile dans le second cadre; celle-ci sert à fixer l'objet d'une façon convenable.

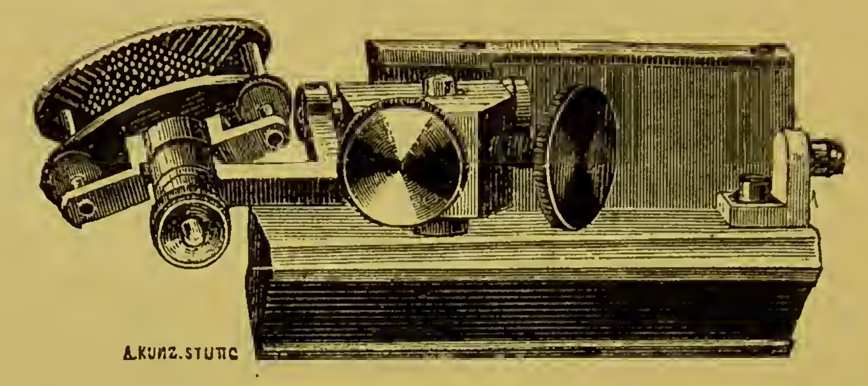


Fig. 99.

La figure 99 représente une modification de la pince de Naples dans laquelle le cadre-support est supprimé.

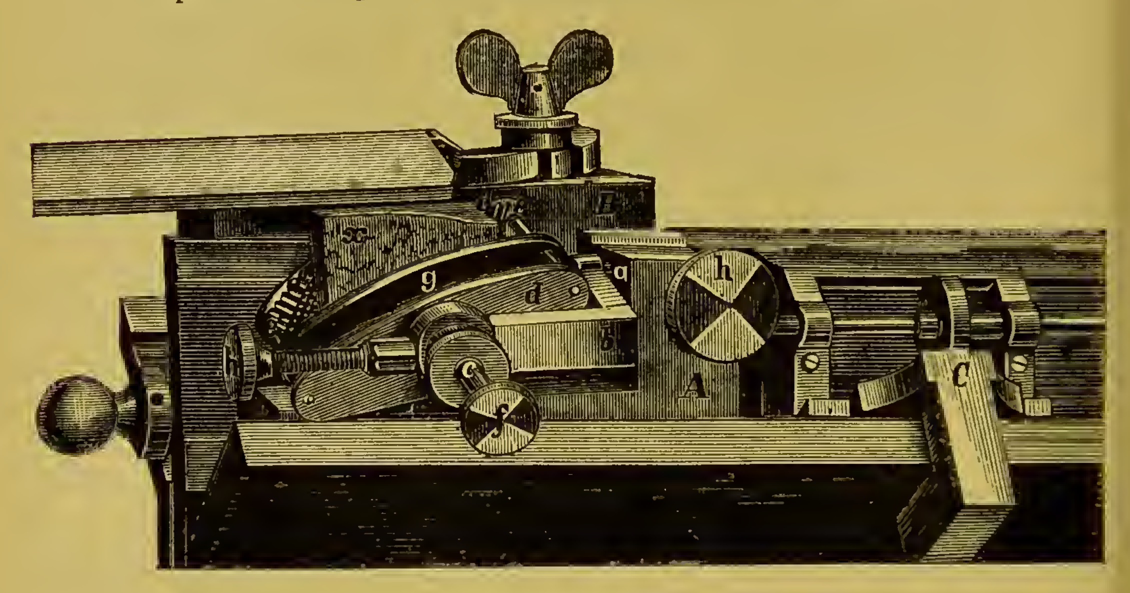


Fig. 100.

La figure 100 montre cette pince appliquée sur le microtome.

Dans le cadre *dd* se meut, par une vis *f*, une plaque *g*

qui maintient convenablement l'objet *x* que l'on veut couper. Au lieu du cadre-support pour maintenir *dd*, on voit une barre *b* coudée à angle droit qui s'introduit en *a* dans le chariot A ; une vis de pression *h* assure la stabilité de cette barre. La vis *h'* maintient dans la position désirée le cadre *dd*.

C représente la partie du support de la vis micrométrique qui fixe cette dernière au microtome ; B est le support du rasoir.

Jung construit également une pince plus perfectionnée

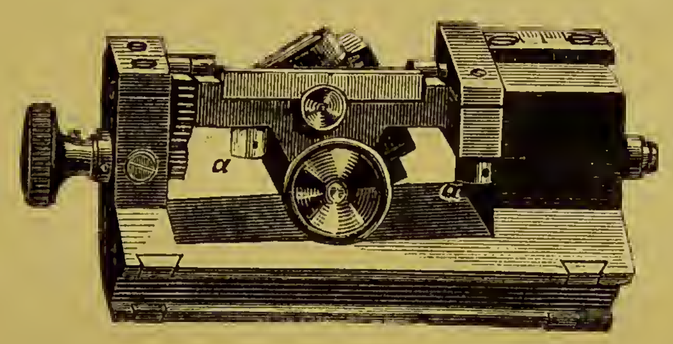


Fig. 101.

encore (fig. 101). Cette pince permet le mouvement de l'objet suivant deux axes perpendiculaires; l'orientation est donnée à l'objet par le mouvement de deux roues dentées; on obtient ainsi des directions précises avec la plus grande facilité.

L'objet est introduit dans des cylindres que l'on fixe dans le creux de la pince; ils peuvent être élevés à des hauteurs convenables; une vis les maintient dans leur position. *aa* sont deux vis que l'on ferme pour obtenir des positions stables suivant les axes.

MICROTOME D'APRÈS KORTING.

Pour élever à chaque coupe l'objet à sectionner, nous venons de voir dans les microtomes, d'après Rivet, que le chariot montait un plan incliné. Korting a remplacé cette disposition par une vis micrométrique qui élève la pince sur

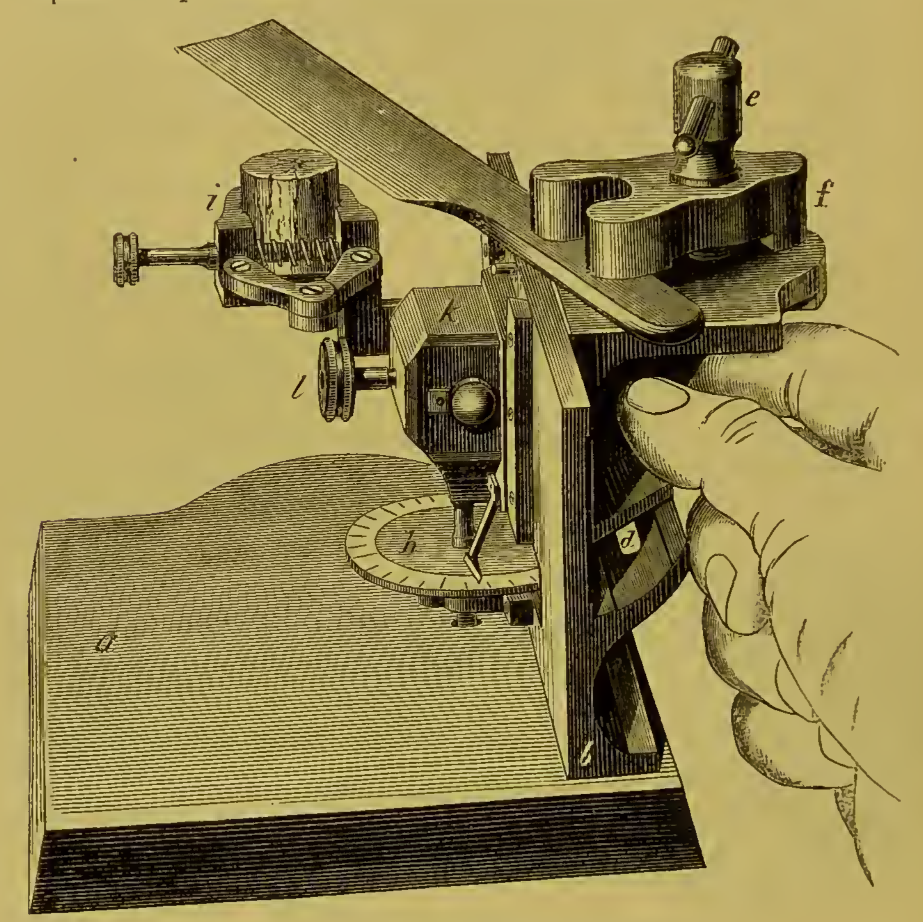


Fig. 102.

laquelle la pièce est placée d'une longueur convenable (fig. 102).

Le microtome de Korting a été construit par Zeiss; il est

formé d'un support en laiton composé d'une plaque *a* sur laquelle une autre *b* est placée perpendiculairement; d'un côté se trouve une rainure, semblable à celle sur laquelle glisse le rasoir dans le microtome de Thoma ; de l'autre côté, on voit une vis micrométrique qu'un disque gradué *h* fait

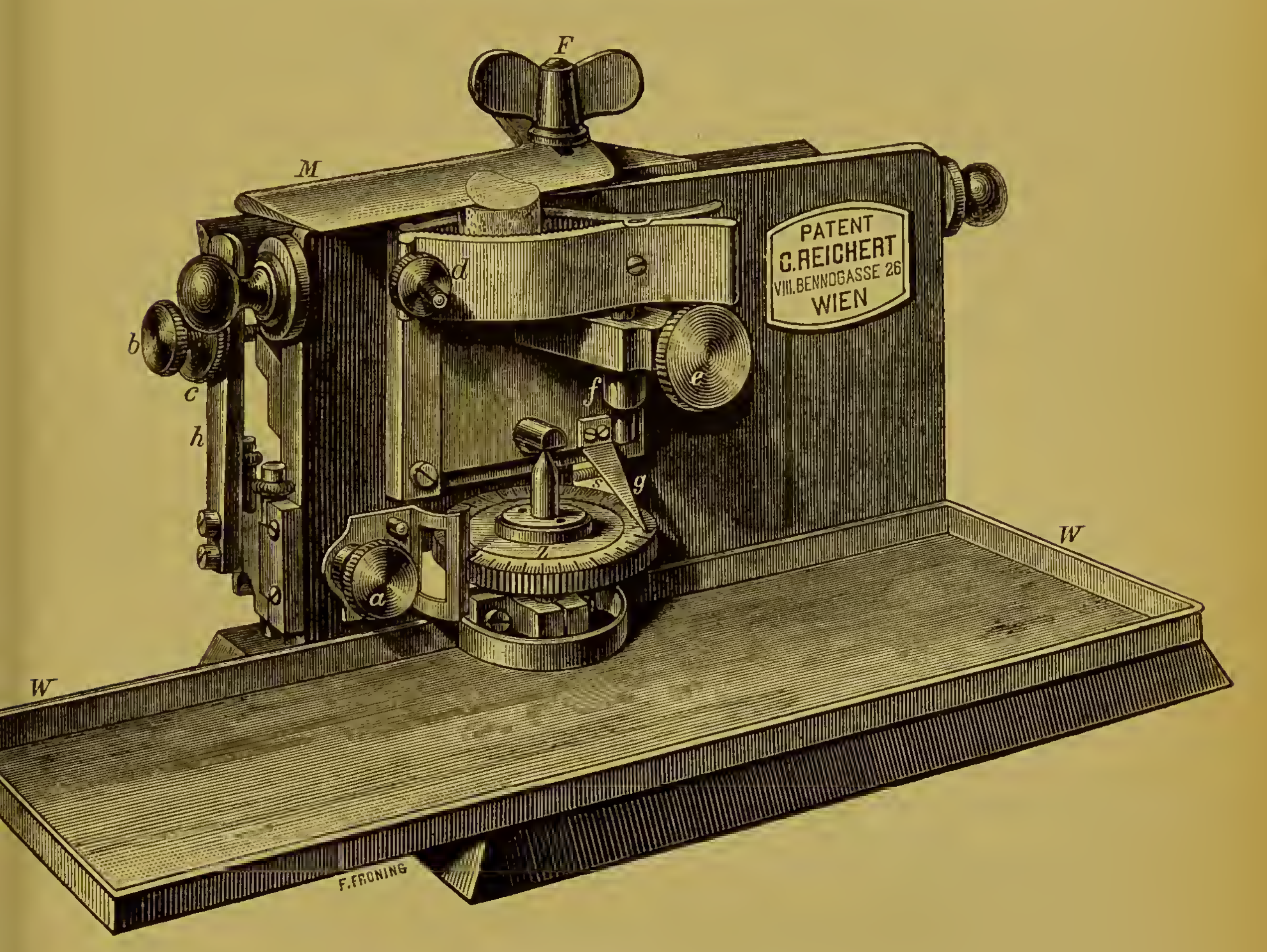


Fig. 103.

mouvoir. La vis élève la pièce *k* qui porte la pince *i*. Dans celle-ci est fixé l'objet. Quant au rasoir, il est adapté sur le chariot par une vis de pression *e* que montre la figure.

MICROTOMES DE REICHERT.

Le microtome représenté par la figure 103 offre des perfectionnements qui méritent d'être connus. L'instrument est automatique; il réalise ainsi une grande économie de temps; il fatigue beaucoup moins que les appareils du même genre avec lesquels on est obligé de consulter toujours une graduation.

L'appareil qui nous occupe est formé d'un support en fonte sur lequel est adapté un plan incliné seulement par rapport au plan perpendiculaire et médian de l'instrument; on a ainsi une gouttière où se meut le chariot *porte-rasoir*, qui glisse par cinq points sur trois surfaces polies et peu larges; le frottement est ainsi réduit à un minimum comme dans le microtome de Jung. Le rasoir M, appliqué par l'intermédiaire d'une vis F sur le chariot, accomplit un mouvement régulier suivant un plan horizontal.

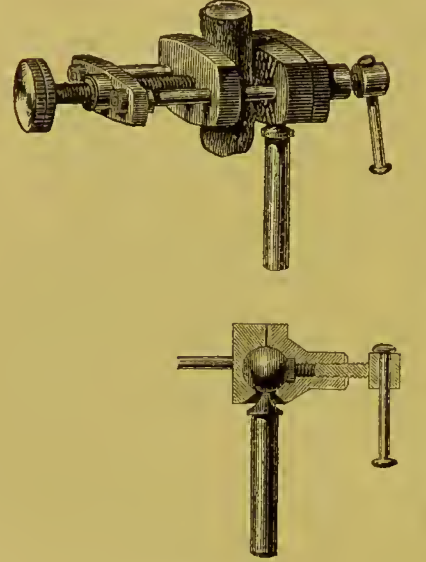


Fig. 104.

L'objet est placé dans une *pince-étau d*, comme le montre la figure 104; mais une autre disposition bien préférable peut remplacer cette dernière : l'objet est fixé entre deux plaques (fig. 104) métalliques, dont l'une, mobile, est commandée par une vis de pression; par l'intermédiaire d'un emboîtement à genou, la pince que nous décrivons peut être

inclinée dans toutes les positions. Une vis micrométrique soulève successivement la plaque métallique sur laquelle la pince porte-objet est appliquée. Une roue, portant à sa périphérie 100 dents également espacées, permet de mouvoir la vis; celle-ci, par un tour entier, soulève l'objet de $^5/_{10}$ de millimètre; chaque dent correspond donc à une élévation de 0,005 de millimètre et donne une hauteur de coupe de cette valeur.

Primitivement, la graduation des microtomes du même constructeur donnait des coupes de 0,0075 par division (*Journal of the Royal Microscopical Society*, octobre 1884).

On comprend qu'il sera possible d'obtenir des tranches ayant, suivant les besoins, telle épaisseur qu'on le désirera, en faisant avancer la roue dentée d'un nombre de divisions convenable.

Pendant ce travail, on peut, si c'est nécessaire, soulever l'objet à telle hauteur qu'on le voudra, indépendamment de la vis micrométrique par le moyen d'une tige verticale *f* qui supporte le tout et que l'on fixe par la vis *e*.

Comment est obtenu l'automatisme si simple d'ailleurs et pourtant si ingénieux? Le chariot porte-rasoir, arrivé au bout de sa course, bute contre un levier dont le bras horizontal (caché dans la figure) prend dans la roue dentée *r*; celle-ci, sous l'impulsion du levier, avance d'une ou plusieurs divisions, suivant que l'on aura plus ou moins fait ressortir la vis *b* de son écrou ; l'épaisseur des coupes peut ainsi être réglée; le cercle gradué peut tourner de $^1/_{10}$ de tour (10 divisions) par un seul mouvement du levier; c'est là le maximum nécessaire d'ailleurs.

Quand la pression du chariot contre le levier cesse, ce

b
c
PATENT
CARL REICHERT,
VIII. BENNOGASSE No 26.
WIEN
K
a
d
S
S
e
g
f
W
h
W

Fig. 105.

dernier reprend la position de repos en même temps que son extrémité s'enfonce dans un creux d'une dent de la roue ; un ressort à boudin *s* produit cet effet par sa détente ; le tout est ainsi ajusté de façon à mouvoir de nouveau la roue au coup de rasoir suivant.

Une vis *a*, agissant sur une pièce munie d'un ressort, fait arrêt dans le cercle denté et empêche celui-ci d'accomplir une course trop grande sous l'impulsion du levier. Un bruit d'échappement annonce à l'oreille le nombre de divisions exécutées par la roue.

En détachant le ressort *s* du levier, l'automatisme est mis hors d'activité.

Quand on préférera connaître, sans entendre de bruit, le nombre de divisions produites par la roue, il suffira de tourner la vis *a*.

La pince, montant toujours, arriverait bientôt à la hauteur du rasoir ; et ce dernier, en contact avec des pièces métalliques, se trouverait ainsi hors d'usage. Cet inconvénient est évité parce qu'alors le levier n'agit plus sur la roue dentée.

Nous avons essayé le microtome que nous venons de décrire : il permet un travail rapide ; les coupes sont régulièrement épaisses : elles peuvent atteindre la finesse que donnent les appareils construits par Jung. Le prix de cet instrument (65 fl. avec deux rasoirs) est modéré si on le compare à celui des autres constructeurs de microtomes.

M. Reichert construit un autre instrument (fig. 105) plus grand qui permet au rasoir une course plus longue (prix de 110 fl.).

Un appareil à congélation peut être adapté aux instruments représentés par les figures 103 et 105.

MICROTOME DE MALASSEZ.

Verick construit un microtome imaginé par Malassez. Ce que cet instrument présente d'intéressant et d'original, c'est qu'il peut se renverser comme le montre la figure 107 ; on coupe alors les objets sous l'eau ou mieux sous l'alcool. On se rappelle que pour certaines masses d'inclusion, la

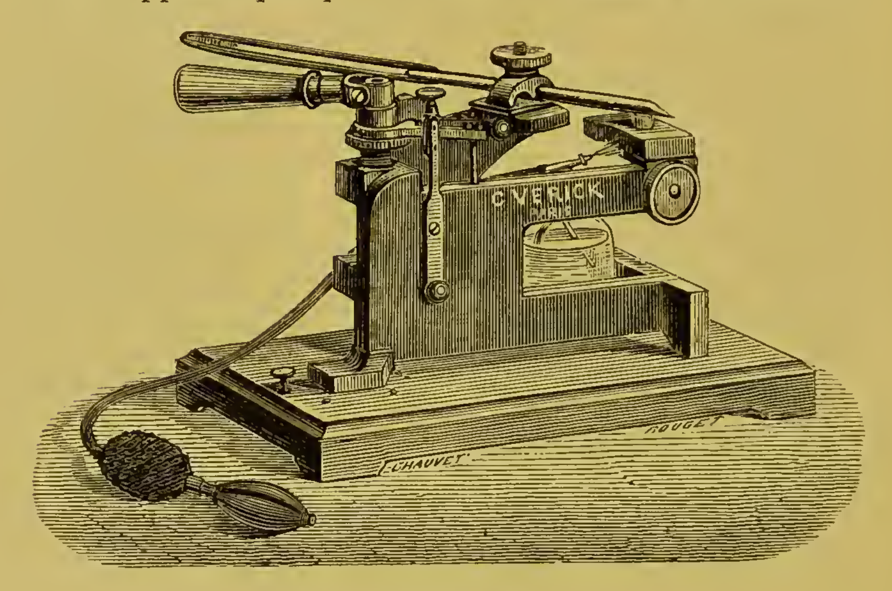


Fig. 106.

celloïdine, le savon, etc., il faut mouiller constamment le rasoir à mesure que l'on coupe. Cette manœuvre n'est pas sans présenter quelques ennuis. Le microtome qui nous occupe évite ce désagrément.

Dans le microtome de Malassez (fig. 106), l'objet est fixe; il est maintenu dans une pince-étau d'une forme particulière. Le rasoir est successivement élevé avec toute la pièce qui le porte par l'intermédiaire d'une vis micrométrique. Tout

rasoir peut être appliqué par un mécanisme très simple.

L'instrument est disposé surtout pour obtenir des coupes par congélation quand il est placé dans la position verticale.

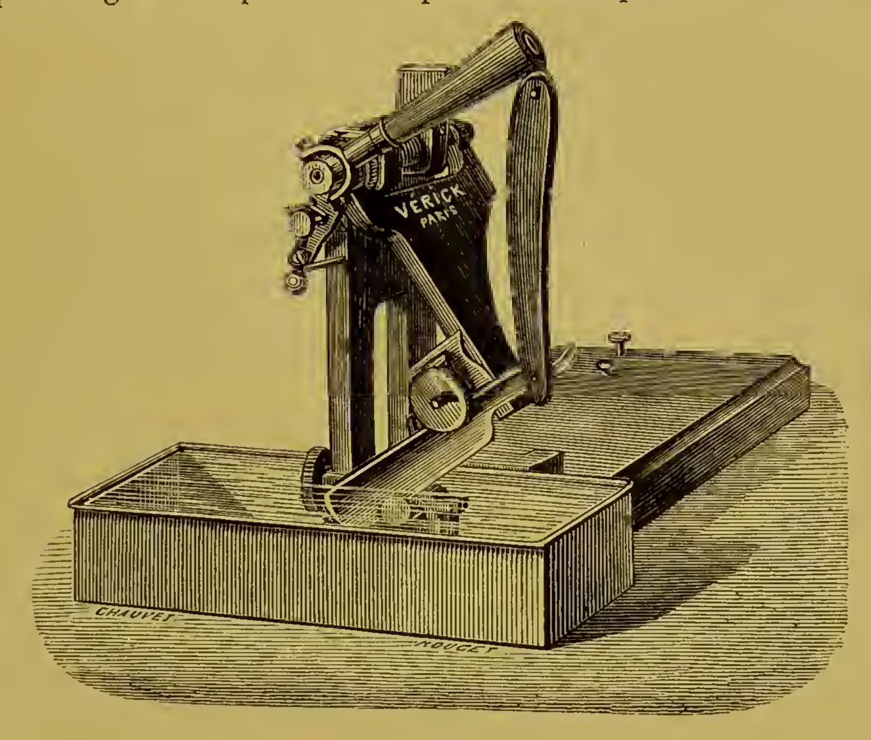


Fig. 107.

Ajoutons que les sections se font automatiquement et qu'elles ont une épaisseur déterminée.

Modifications dont sont susceptibles les microtomes à plan incliné et à glissement, d'après Rivet Thoma. Il résulte d'un grand nombre d'expériences que nous avons faites, que les glissières proposées par Thoma et les cinq points d'appui des chariots sont avantageusement remplacés par la disposition que nous allons indiquer : au lieu d'incliner les plans sur lesquels glissent les deux chariots par rapport à la verticale, pour former ainsi une gouttière, nous plaçons ces

plans sans les faire obliquer par rapport au plan médian et vertical du support (il va sans dire que par rapport à l'horizontale, le plan qui porte le chariot porte-objet est encore incliné). Ainsi, il n'y a plus de gouttière aux deux côtés du microtome. Sur les deux plans, nous appliquons dans toute la longueur deux barres prismatiques en acier et en forme de couteau de balance. Les chariots portent trois rainures correspondant aux prismes. Deux rainures s'adaptent dans le même prisme, la troisième rainure repose sur l'autre prisme. Les trois points d'appui occupent ainsi les sommets d'un triangle. Dans la longueur correspondant aux prismes, le chariot est évidé; ainsi, il n'y a de frottement qu'aux points de contact. Il n'y a donc que trois points d'appui, ce qu'il faut pour produire un plan bien uniforme.

Les mouvements de latéralité ne sont pas possibles, parce que les prismes et les rainures s'emboîtant parfaitement, ne permettent aucune déviation. Quant à l'usure, elle se fait uniformément, et on peut croire qu'elle n'aura ainsi aucun résultat fâcheux qu'après un long emploi.

La glissière des microtomes, d'après Korting, peut subir également les modifications dont nous venons de parler.

Dans ces derniers temps, Auguste Becker, mécanicien à Göttingen, a construit différents modèles de microtome sur lesquels les glissières sont en verre. C'est sur des lames de glace que roulent par cinq points les deux chariots. Le même constructeur a encore apporté quelques modifications ingénieuses à ces appareils; c'est ainsi que le chariot du rasoir n'est plus conduit à la main; mais une courroie, passant sur quatre poulies, imprime le mouvement à ce chariot par l'intermédiaire d'une manivelle appliquée à l'une des poulies.

RASOIRS.

La plupart des microtomes exigent un rasoir spécial, qui est fourni en même temps que l'instrument.

Au microtome de Jung, on peut adapter un rasoir de

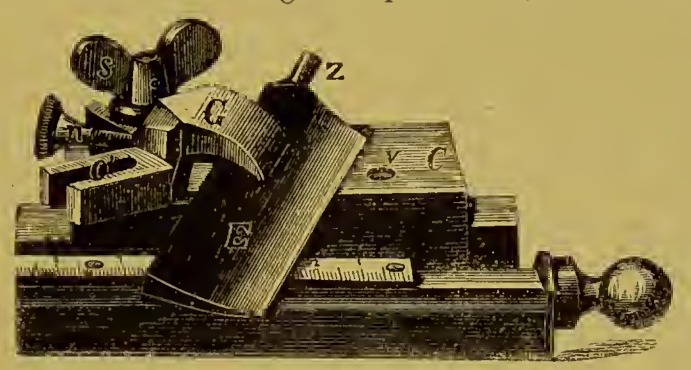


Fig. 108.

grande forme, se fixant directement sur le chariot à l'aide

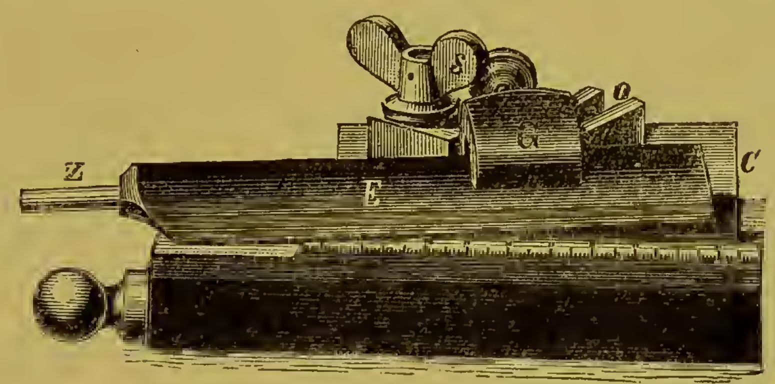


Fig. 109.

d'une vis de pression (fig. 95), ou bien un rasoir plus petit, s'appliquant à l'aide d'un ajutage représenté par les figures 108 et 109.

Cette dernière pièce est formée d'une coulisse G, où le

rasoir E est glissé par le dos et tenu dans une position stable par une vis *n*; deux rainures O et une vis S attachent le tout intimement au chariot C.

Dans la figure 108, le rasoir est fixé tranversalement; cette disposition permet d'obtenir des coupes en ruban. Dans la figure 109, on voit le rasoir placé obliquement.

Comme on le remarquera dans la figure 108, la section du rasoir montre que ce dernier est formé d'une surface

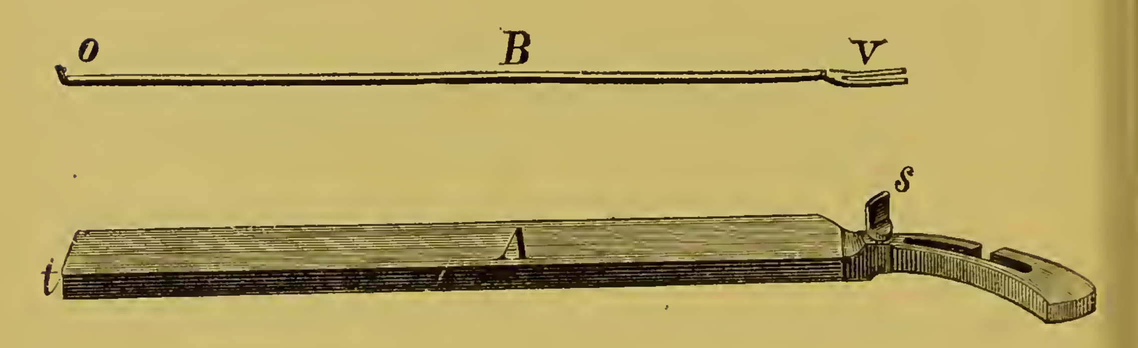


Fig. 110.

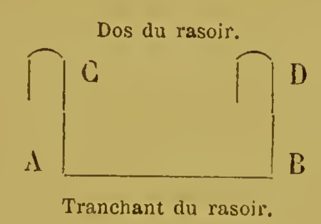
courbe supérieure et d'une surface plane inférieure. Pour repasser le rasoir sur la pierre ou sur le cuir et pour que le tranchant soit bien uniforme des deux côtés de la lame, Jung applique au dos du rasoir, vers la surface plane, une tige O B V (fig. 110), qui s'adapte en *t* sur la lame dans une fossette, et en *s*, par la fourchette V; de cette façon, en promenant le rasoir sur le cuir ou la pierre pour obtenir de chaque côté une égale usure, l'inclinaison est la même.

Pour repasser le rasoir transverse, on applique en Z (fig. 108) un manche en bois.

Jung fournit un cuir excellent, que l'on enduit de temps à autre d'une substance rouge pour repasser.

APPAREILS POUR EMPÊCHER LES COUPES DE S'ENROULER.

Jung construit encore un appareil pour empêcher les coupes de s'enrouler; c'est une tige métallique qui vient s'appliquer sur le tranchant du rasoir (fig. 95); elle est suspendue au dos du couteau à l'aide d'un mécanisme qu'un ressort fixe d'une façon stable. Nous avons remplacé cet appareil assez compliqué et assez cher par un autre, beaucoup plus simple, et que tout le monde peut construire. Nous plions un fil de fer de 1 mm. de diamètre (ou mieux, une aiguille à tricoter; nous nous servons dans ce cas, pour la rougir, de la lampe à alcool) à deux angles droits, les sommets A et B étant distants de 7 à 8 centimètres.



Nous recourbons les branches libres AC et BD en crochet, de façon à faire tenir tout le système au dos du rasoir. Les branches AC et BD doivent avoir une longueur telle que AB vienne s'appliquer à un ou deux dixièmes de millimètre en arrière du tranchant.

En coupant, les tranches viennent s'enrouler imparfaitement autour de la tige AB. Il est facile alors de les transporter sur le porte-objet et de leur faire prendre une surface plane, ce qui arrive d'ailleurs presque toujours naturellement. Le petit appareil que nous venons de décrire rend

identiquement les mêmes services que celui que Jung construit. Il peut s'appliquer au rasoir quand on coupe à main libre. Mais le plus souvent, on empêchera les coupes de s'enrouler en appuyant légèrement un pinceau au moment où la pièce est entamée par le rasoir contre la section qui a commencé à se produire. On a conseillé aussi de faire usage, pour obtenir le même résultat, d'une aiguille à cataracte ou d'une petite spatule en platine ; il arrive qu'avec les instruments, le tranchant du rasoir est endommagé; ce désagrément n'est pas à redouter avec le pinceau que nous préconisons.

TROISIÈME PARTIE.

EXERCICES.

A l'aide des méthodes que nous avons décrites et avec les renseignements que nous avons donnés sur chacun des réactifs mis en usage dans les recherches micrographiques, il sera possible de se livrer à l'étude histologique de n'importe quel être organisé. Mais pour éviter aux débutants les tâtonnements longs et pénibles, nous avons cru utile de terminer ce manuel en indiquant une série d'exercices sur l'HISTOLOGIE, l'EMBRYOLOGIE et l'ANATOMIE COMPARÉE. Nous ne nous occuperons, toutefois, que d'un certain nombre de manipulations types, laissant au futur micrographe le soin de chercher par lui-même, en se guidant sur les notions qu'il aura acquises en travaillant comme nous l'avons proposé. En découvrant ainsi par soi-même la marche de travail, on acquerra la spontanéité si nécessaire pour réussir dans la science.

Quand les préparations microscopiques concernant un sujet quelconque seront obtenues, on étudiera en s'aidant des livres ou cahiers de cours que l'on aura à sa disposition. On dessinera ensuite avec tous les soins désirables et en con-

sultant les gravures des ouvrages. On arrivera rapidement, avec un peu de persévérance, à reconnaître sur les préparations les différents organes et à en déchiffrer la texture.

I

EXERCICES HISTOLOGIQUES.

Avant tout, il est nécessaire d'avoir des idées exactes sur la cellule et les différents tissus qui constituent les animaux. Aux différentes personnes qui ont travaillé sous notre direction, nous avons proposé, presque dès les débuts, l'exercice que nous allons décrire. Les succès obtenus en procédant ainsi ont été tels que nous n'hésitons pas à commencer de la sorte.

A. — Une larve de TRITON, de SALAMANDRE ou un TÊTARD DE GRENOUILLE, ayant déjà les quatre membres (1 ½ cent. de long), est traité par le liquide d'Erliki ou par le liquide de Müller, auquel on ajoute par litre 3 gr. d'acide chromique (p. 191).

B. — Après 24 heures d'immersion, on lave à l'eau et on passe de 12 en 12 heures dans chacun des alcools à 70°, 90° et à 100°. Quatre jours sont nécessaires pour amener le durcissement complet par l'alcool absolu.

C. — On colore en masse par le picro-carmin; deux ou trois jours sont nécessaires pour arriver à une coloration suffisante.

D. — On repasse par les différents alcools (5 à 6 heures dans chacun). Dans l'alcool à 100°, qui doit amener la déshydration, on laissera deux jours.

Les opérations seront continuées suivant le tableau VII,

à partir de E^1. — E^1a, 6 heures; — E^1b, 6 heures; — E^1c, 6 heures; — E^1d, 12 heures; — F^1, 18 heures; — G, 24 heures. Il se peut qu'on ne puisse tenir la paraffine pendant un temps aussi long à la température de 56° à 60°. Mais alors, il suffira de chauffer à plusieurs reprises, soit 2 fois 12 heures ou 3 fois 8 heures.

II. — I. — On coupera transversalement à main libre ou au microtome. — Ja^1 et Ja^2. — Nous conseillons les deux procédés simultanément. — K, L^1, M^1, N ou L^2 M^2 et N, suivant les circonstances.

Remarquons que l'on acquiert bien vite à main libre l'aptitude nécessaire pour arriver à des coupes suffisamment fines, qui permettent d'étudier sous le microscope à l'aide de grossissements de 100 à 150. Il est intéressant de conserver toutes les préparations, quelques défectueuses qu'elles puissent paraître.

Si les manipulations sont bien conduites, ce qui ne présente pas de bien grandes difficultés, nous l'affirmons, on procédera à l'étude des coupes. On examinera d'abord l'ensemble de la préparation à un faible grossissement, 50 diamètres au maximum. Si l'on tient compte de la région coupée, on saura bien vite quels sont les principaux organes que l'on a sous les yeux.

Remarquons d'abord que chez les êtres dont nous nous occupons actuellement, le squelette est cartilagineux ; aucune texture osseuse ne s'est encore formée nulle part. Là donc où l'on devrait trouver des os, il n'y a que du cartilage. C'est d'abord le tissu que le débutant étudiera sur les coupes, parce qu'il le découvrira le plus facilement. On verra la *substance fondamentale* colorée en rouge intense.

Les cellules qui apparaîtront hyalines présenteront des sections elliptiques; le noyau sera également coloré en rouge; on y distinguera des granulations, peut-être même des figures karyokinétiques, surtout si l'on a choisi le triton ou la salamandre. On lira dans un traité d'histologie convenable la description du tissu cartilagineux; cela suffira pour le reconnaître immédiatement sur la préparation.

Le tissu musculaire strié se découvrira également bien. Si l'on observe les faisceaux de fibres musculaires coupées longitudinalement, on distinguera la substance musculaire striée, le sarcolemme et les gros noyaux caractéristiques qui y sont appliqués.

Sur la peau, on verra la limite entre le derme et l'épiderme; ce dernier présente d'abord une couche superficielle de cellules plates, puis une autre couche de cellules cylindriques dont les sections seront perpendiculaires aux cellules plates. Dans la peau, on découvrira, en outre, des glandes dont les conduits débouchent à l'extérieur; cela suffira déjà pour se faire une idée d'une glande, si l'on a soin de consulter en même temps le traité d'histologie.

On s'occupera ensuite de l'épithélium de la bouche, de l'estomac et de l'intestin. On étudiera la paroi de ces deux derniers organes. On examinera les glandes qu'on y rencontre.

Dans les coupes, on rencontrera des espaces circulaires à paroi plus ou moins compliquée : ce sont des sections de vaisseaux; ils sont remplis de corpuscules jaunâtres (corpuscules sanguins) contenant des noyaux.

Le tissu des différentes parties du système nerveux ne sera pas plus difficile à découvrir. Il arrivera que, sur

certaines coupes, les racines antérieures motrices et les racines postérieures sensitives se montreront pénétrant dans la moelle, chacune partant d'un ganglion nerveux commun.

La coupe des yeux montrera la section du cristallin avec sa capsule, son épithélium, ses fibres antérieures et postérieures; on aura sous les yeux une figure qui, sous le rapport de la netteté, sera comparée au schéma que tous les traités d'histologie donnent du cristallin. Quant à la rétine, elle se trouve encore à l'état embryonnaire; mais on y distingue déjà des différenciations intéressantes. Quelquefois, on aura sur la coupe la section du nerf optique. La cornée, la choroïde, etc., seront également bien examinées.

L'oreille interne, la foie, le cœur, les reins (reins primitifs) et les différentes organes méritent également de fixer l'attention du micrographe.

PRÉPARATION DE L'OEUF DES MAMMIFÈRES.

Nous conseillons de choisir les ovaires de la souris pour en extraire les ovules, parce que chez cet animal les organes sont petits et qu'il est ainsi possible de dilacérer complètement sur le porte-objet ou dans un verre de montre. Pour les découvrir, on ouvrira l'abdomen d'une souris que l'on vient de sacrifier, on suivra le vagin, puis l'utérus se bifurquant, on verra presqu'à son extrémité deux organes jaunâtres ovoïdes, placés symétriquement et attachés à l'utérus.

On versera sur un porte-objet quelques gouttes du liquide de Kronecker; puis, on procédera à la dilacération en attaquant avec les aiguilles emmanchées les vésicules transpa-

rentes, hyalines qui proéminent sur l'ovaire (vésicules de Graaf). Cette opération terminée, on cherchera, à l'aide du microscope, s'il s'y trouve des *ovules;* l'examen de la figure dans le livre d'histologie suffit pour les faire reconnaître. Quand on les aura aperçus, s'ils sont environnés d'une grande quantité de substances granuleuses, on essayera d'enlever celles-ci.

On se procurerait également bien dans les abattoirs des ovaires de vache et de brebis. Pour ce qui est de ce dernier animal, il suffit de demander la matrice au premier abatteur venu pour qu'il vous apporte immédiatement tout l'appareil sexuel interne. On reconnaîtra facilement les ovaires, qui forment deux corps ovoïdes jaunâtres dont le plus grand diamètre a environ 15 mm.

On ouvrira sur le porte-objet les vésicules de Graaf, et on examinera sous le microscope si, dans le liquide écoulé, il n'y a pas d'ovule; souvent, il sera nécessaire d'extraire complètement le contenu de la vésicule, l'œuf restant attaché, englobé par les matières albuminoïdes.

Quel que soit l'animal sur lequel on a pris les ovules, on examinera d'abord à l'état frais, puis, pour obtenir des préparations définitives, on suivra le procédé indiqué au tableau I pour l'étude des infusoires.

Toutefois, en B, il convient de fixer par l'acide osmique, en faisant réagir ce réactif, non pas en solution, mais sous forme de vapeurs et dans la chambre humide (voir page 183). On continuera la suite des opérations à partir de C inclusivement.

Par des coupes, disons-le dès maintenant, l'on étudiera également l'ovaire. En prenant cet organe sur la souris, ce

que nous conseillons, on suivra la marche du tableau VII, et en observant le temps que nous allons indiquer pour le séjour dans les différents liquides : — A, séjour dans le liquide d'Erliki, 24 heures; — B*a*, B*b*, 6 heures; — B*c*, 24 heures; — D*a*, D*b*, 6 heures; — D*c*, 24 heures; — E^1a, 6 heures; — E^1b, 9 heures; — E^1c, 12 heures; — E^1d, 12 heures; — F^1, 12 heures: — G, 12 heures. — Les opérations, rappelées sous les lettres H, I, Ja^1, K, L^1, M^1, N, se font successivement.

Si l'on veut couper de même l'ovaire de mouton, il faudrait augmenter le temps d'immersion dans chacun des liquides et procéder comme s'il s'agissait de la préparation du têtard de grenouille.

PRÉPARATION DES OVULES DE LA GRENOUILLE.

On ouvre une grenouille femelle que l'on vient de sacrifier. On trouvera sans peine les ovaires, qui se présentent sous forme de deux masses granuleuses pointillées de noir, placées aux deux côtés de la ligne médiane dans l'abdomen. On détachera les plus petites granulations qu'il est possible de voir à l'œil nu; ce sont des ovules en voie de formation; elles ne contiennent pas encore de pigments, et elles paraissent jaunâtres. On les immergera sur le porte-objet dans le liquide de Kronecker (1). On étudiera ainsi sur le frais et à l'aide du microscope.

En vue d'obtenir des préparations définitives, on traitera

(1) C'est après l'époque du frai ou sur des grenouilles de petite taille qu'on obtiendra le plus facilement les ovules en voie de formation.

un certain nombre de fragments de l'ovaire contenant des œufs en voie de formation, en suivant la marche indiquée dans le tableau I. Pour la *fixation* B, on choisira l'acide acétique, l'acide nitrique à 20 p. c., l'acide picro-sulfurique de Kleinenberg, etc. Il est intéressant et instructif de se servir ainsi de plusieurs réactifs à la fois sur différentes préparations, afin de comparer les résultats obtenus sous l'influence de différents agents.

On ne laissera agir que quelques minutes l'acide acétique et l'acide nitrique; puis, on lavera à l'eau. On exécutera les opérations rappelées sous les lettres C*a*, C*b*, C*d* (10 en 10 minutes). On colorera par le carmin aluné, la teinture de cochenille de Czokor, l'acide carminique ou le picro-carmin, de façon à obtenir une préparation teinte par chacun des réactifs colorants les plus usuels. On appréciera ainsi relativement ce que chacun de ces liquides peut donner sur le même sujet.

L'œuf ovarien de la grenouille présente, outre cette particularité de posséder un noyau contenant plusieurs nucléoles, de présenter encore un corps dont la signification n'est pas bien connue et qui a l'aspect d'un noyau; on a appelé ce corps : noyau vitellin, noyau de Balbiani. Comme exercice, nous conseillons encore de préparer les œufs ovariens du *Triton cristatus* et de l'épinoche d'après la méthode que nous venons de décrire.

ÉTUDES DE LA CIRCULATION CHEZ DIFFÉRENTS ANIMAUX.

BATRACIENS. — Pour étudier la circulation chez les batraciens, le moyen le plus simple est de placer une larve de

triton ou de *salamandre* dans un verre de montre contenant de l'eau. Dans les branchies externes de ces animaux, on verra sous le microscope, à un grossissement même faible, le sang circuler dans les petites artères, les petites veines et les capillaires de ces organes.

Quand on voudra étudier le même phénomène chez la grenouille, il sera très utile de la rendre insensible et immobile, soit par une injection sous-cutanée au curare, soit ce qui se produit encore plus facilement, en soumettant sous une cloche l'animal aux vapeurs de chloroforme. Il suffit pour cela de se servir de la chambre humide dont nous avons déjà parlé et sous laquelle on introduit quelques gouttes de chloroforme.

La grenouille sera ensuite ensevelie dans un maillot de toile.

On l'attachera sur une plaque de liège en ne laissant passer que l'un des membres postérieurs. Dans la plaque, on aura pratiqué, au préalable, une petite fenêtre au-dessus de laquelle on amènera la membrane interdigitale du sujet que l'on veut mettre en observation. Les doigts seront attachés convenablement avec des épingles, de façon que le pied soit parfaitement étalé. Le tout sera fixé ensuite sur la platine du microscope en prenant les précautions pour assurer une stabilité parfaite.

En amenant la langue d'une grenouille immobilisée comme nous venons de le voir, et en étalant cet organe au-dessus d'une petite fenêtre pratiquée dans une lame de liège, on étudiera la circulation dans les capillaires. On étudiera de même la circulation sur le mésentère de la grenouille. On incisera l'animal sur l'un des flancs, et l'on atti-

rera au dehors une anse de l'intestin. Le fragment de mésentère qui se présentera avec ce dernier sera placé au-dessus de l'ouverture pratiquée dans une lame de liège. On procéderait de la même façon avec le poumon.

Un têtard de grenouille étant emmailloté dans un fragment de papier-filtre mouillé, on le fixe, ainsi immobilisé, de façon que la queue du petit être arrive exactement au-dessus d'une fenêtre coupée dans une lame de liège. On fixe sous le microscope et on recouvre d'une lamelle, si on le trouve nécessaire.

Poissons. — On entoure un porte-objet bien sec d'un rebord en papier de 1/2 centimètre. On forme ainsi une petite boîte dans laquelle on coule de la paraffine liquide chauffée à 70°. La solidification étant sur le point de se produire, on immerge un épinoche de la taille de celui que l'on veut mettre en observation; on le couche sur le côté. On a soin de faire en sorte que l'animal ne soit pas retenu dans la paraffine qui se solidifie. Il suffit pour cela de mouiller le petit poisson.

Par ce moyen, une empreinte sera creusée dans le bloc de paraffine; là où la nageoire caudale a imprimé sa trace, on enlèvera complètement la paraffine, la laissant partout ailleurs.

Dans le moule préparé comme nous venons de le voir, on introduira un épinoche vivant en le recouvrant d'un peu d'eau. On le fixera avec de petites bandes de papier-filtre qui seront attachées avec des épingles que l'on enfoncera dans la paraffine. On fixera la préparation sur la platine du microscope, de manière que la nageoire caudale soit sous l'objectif. En taillant convenablement la paraffine, on com-

prendra sans peine qu'il sera facile de recouvrir d'une lamelle.

Nous engageons vivement le débutant à pratiquer ces dernières manipulations, surtout avec l'épinoche. La nageoire caudale étant complètement transparente, le phénomène de la circulation se montre ici d'une façon admirable; on voit le sang arriver dans de petites artérioles, passer ensuite dans des capillaires si fins, que les globules sanguins se rétréeissent et s'allongent pour continuer leur marche à travers ces fins canaux; les capillaires se réunissent en veinules et le sang suit une direction absolument opposée à celle qu'il parcourait en arrivant dans les petites artérioles.

Souris. — En immobilisant une souris par une injection de curare au $^1/_{1000}$ et amenant hors de l'abdomen, après en avoir incisé la paroi, on pourra, comme avec la grenouille, examiner la circulation chez ce petit mammifère.

ETUDE DU SANG ET DE LA LYMPHE.

On place sur le porte-objet une goutte de sang de grenouille; on examine au microscope; on étale convenablement de façon que la couche ne soit pas trop épaisse; on étudie sans faire subir aucune opération.

Manipulations. A. — Une goutte de sang étant étendue sur le porte-objet, on place ce dernier dans la chambre humide pour y subir l'influence des vapeurs d'acide osmique.

B. — Après quelques minutes, on ajoute de l'alcool au $^1/_3$; on recouvre d'une lamelle, puis on fait successivement pénétrer les alcools à 70° et à 90° à l'aide du papier buvard.

C. — On ajoute une goutte de solution de picro-carmin qui colore les noyaux en une demi-heure.

D. — Le picro-carmin est remplacé par la glycérine. La préparation est lutée comme il a été indiqué précédemment. On trouvera dans la préparation des globules rouges et des globules blancs dont les noyaux seront colorés.

Mouvements amœboïdes des globules blancs. — A l'aide d'un tube effilé que l'on enfonce sous la peau d'une grenouille dans les *espaces lymphatiques* (1), à la base du dos, on extrait de la lymphe. On place une goutte du liquide ainsi obtenu sur une lame bien propre que l'on aura passée une ou deux fois dans la flamme d'une lampe à alcool ; on évite ainsi la formation de bactéries. On recouvre d'une lamelle ayant subi la même opération. On examine au microscope. On suivra toutes les phases de transformation que subiront dans leurs formes les globules blancs. En plaçant sur l'une des platines chauffantes que nous avons décrites précédemment et en élevant vers 30°, les mouvements amœboïdes seront bien plus accentués. Mais vers 40° à 42°, les mouvements cesseront complètement. Les globules blancs du sang humain présentent les mêmes phénomènes. Pendant l'observation, il faut élever la température, car les changements de formes ne sont visibles complètement que vers 30°. Pour se procurer du sang, on se fera au doigt une petite piqûre ; avec une aiguille, on prendra un peu du liquide sanguin qui sortira de la blessure.

(1) La peau de la grenouille n'adhère au corps de l'animal qu'en certains endroits par des muscles superficiels; il existe ainsi des espaces assez grands communiquant entre eux et que Langer a appelés *espaces lymphatiques*, parce qu'ils contiennent de la lymphe.

Pour étudier l'action des réactifs sur les différents globules, on procédera comme nous l'avons indiqué plus haut. Welcher, pour obtenir des préparations définitives, humecte de sang une aiguille qu'il place sur une lame pour étaler convenablement le liquide. La température du porte-objet est portée rapidement vers 70°; les globules qui adhèrent au verre se dessèchent immédiatement sans perdre leur forme et sans subir aucun changement dans leurs dimensions.

Si on a à sa disposition un spectroscope microscopique, on placera une goutte de sang sur une lame, et on procédera à l'examen spectroscopique de l'hémoglobine en se servant de l'instrument suivant les indications que l'on trouvera à la page 170.

Pour ce qui est de la numération des globules et de la production des cristaux d'hémine, réaction qui caractérise l'hémoglobine, nous renvoyons aux traités spéciaux et plus particulièrement à l'excellent *Manuel de Microscopie clinique,* par Bizzozero et Firket.

ÉPITHÉLIUMS ET ENDOTHÉLIUMS.

Épithéliums vibratils. 1. — On détache la couche superficielle de la muqueuse, de la langue et du larynx chez une grenouille nouvellement sacrifiée et on place les fragments d'épiderme ainsi obtenus sur une lame dans du liquide de Kronecker. On observe au microscope les mouvements ondulatoires de l'épithélium vibratil. Pour arrêter les mouvements et voir les cils qui les produisent, on fait passer sur la lamelle une goutte de la dissolution d'iode.

2. — On détache sur une grenouille le larynx et on

place dans l'alcool au $^1/_3$ pendant 24 heures. On gratte à l'aide d'un scalpel la partie superficielle de la muqueuse; puis, on dilacère sur quelques porte-objets la substance ainsi obtenue. On exécute ensuite les opérations renseignées au tableau I à partir de C inclusivement. On choisira en D pour colorant le picro-carmin, l'acide carminique, etc. On achèvera les manipulations comme s'il s'agissait des infusoires (exercice 1). On préparera de même l'épithélium de l'estomac et de l'intestin du même animal.

Épithéliums pavimenteux, cylindriques, etc. On aura si souvent l'occasion d'examiner les divers épithéliums sur les coupes que nous n'indiquerons pas pour chacun des exercices à faire.

Épithélium du poumon de la grenouille. On injecte, à l'aide d'une seringue, du nitrate d'argent à $^1/_{200}$ dans les poumons d'une grenouille que l'on aura ouverte complètement. On pousse l'injection de façon à distendre convenablement le poumon. Quand la membrane est devenue laiteuse (quelques minutes), on ouvre sous l'eau distillée en ayant soin d'étaler parfaitement sur un fragment de bouchon. On lave avec soin et on achève les opérations suivant les indications du tableau I en commençant par C. Pour le temps nécessaire à chaque manipulation, on se rapportera à ce qui est indiqué au 2e exercice à la suite de ce tableau. On préparera de même la vessie de la grenouille en vue d'étudier les cellules qui tapissent cet organe.

Endothéliums. Comme nous l'avons indiqué précédemment, pour préparer les endothéliums, on tend au-dessus d'un petit cristallisoir le grand épiploon d'un chien. On verse du nitrate d'argent sur la membrane ainsi tendue. Quand la

membrane devient laiteuse, on lave à l'eau distillée. L'intervention de la lumière solaire est nécessaire pour produire la coloration en noir de la substance unissante des cellules. On lave à l'eau distillée et on achève suivant le tableau I comme nous venons de le voir pour la préparation du poumon de la grenouille.

Pour voir les cellules endothéliales du mésentère de la grenouille, on traiterait sur une lame par du nitrate d'argent $^1/_{200}$ et on achèverait comme pour préparer l'épiploon du chien.

TISSU CARTILAGINEUX.

Nous avons dit comment on obtiendrait des préparations en coupant de jeunes grenouilles, sur lesquelles on étudierait le cartilage. Cependant, nous croyons nécessaire de faire connaître comment il est possible de préparer le cartilage complètement isolé. Sur une grenouille, on dissèque l'extrémité cartilagineuse du sternum, en enlevant avec soin le tissu conjonctif qui le recouvre. On transporte un fragment de ce cartilage sur une lame dans le liquide de Kronecker et on examine frais. On traite ensuite par l'iode, en faisant pénétrer sous la lamelle une dissolution de ce corps (p. 196). Sur un autre fragment, on fait réagir le chlorure d'or (p. 195) pendant quelques minutes; on lave à l'eau distillée et aux différents alcools, on déshydrate et on monte dans le baume.

En vue d'obtenir une préparation définitive, on prendra un nouveau fragment de ce même cartilage sternal. On le traitera suivant le tableau I à partir de B, en employant *a* ou *b*. On continuera ensuite en se guidant pour les durées

de chaque réaction comme il est indiqué au 2e exercice à la suite du tableau I.

Pour apprécier ce que donnent différents réactifs sur le cartilage, on traitera différents fragments de ce tissu par les acides acétique, nitrique, chromique, le chlorure de platine, etc.

On coupera également, à l'aide d'un rasoir, afin d'obtenir de minces sections, la tête articulaire du fémur de la grenouille; cet os devra, au préalable, séjourner 24 heures dans le liquide de Kleinenberg. Les coupes passeront ensuite par les diverses manipulations que nous venons d'indiquer pour l'extrémité du sternum.

Enfin, pour réaliser la double coloration renseignée à la page 237, on traitera par *l'éosine et l'aniline.*

TISSU CONJONCTIF.

Pour étudier le tissu conjonctif, on emploiera la méthode des injections interstitielles, recommandée par Ranvier. Elle peut se pratiquer sur n'importe quel mammifère; mais il est préférable de choisir le lapin. Sous la peau de cet animal nouvellement sacrifié, on injecte, à l'aide de la seringue de Pravaz, de l'eau distillée : on produit ainsi un œdème artificiel que l'on dissèque ensuite. On enlève les fragments de tissu conjonctif; on les examine sur le frais et on les soumet ensuite à l'action des réactifs. On recommande également les injections intersticielles à l'aide de diverses solutions : le sérum iodé, le nitrate d'argent, l'éosine, etc. Ce tissu sera soumis à la dilacération après macération dans l'alcool au $^1/_3$ pendant 24 heures.

Les *fibres tendineuses* se préparent en traitant les tendons de la queue du rat ou de la souris par l'alcool à 90°, puis en colorant par le carmin picrique et en montant dans la glycérine.

Les tendons des extrémités des membres de la grenouille seront également soumis aux mêmes manipulations. Ces tendons seront mis à macérer dans l'alcool au $^1/_3$; puis, on dilacérera sur la lamelle, on colorera au picro-carmin et on montera dans la glycérine. On en fera des coupes, en employant l'une ou l'autre des méthodes que nous avons décrites précédemment.

Les exercices qui précèdent nous paraissent suffisants, car on aura souvent l'occasion d'étudier sur des coupes le tissu conjonctif.

TISSU MUSCULAIRE.

Muscles striés. — Ce que nous venons de dire pour le tissu conjonctif est également applicable au tissu musculaire : sur des sections d'animaux, on aura souvent sous les yeux des fibres musculaires. Il importe pourtant d'isoler les fibres et de les étudier complètement individualisées.

1. Si, sur un muscle frais, on procède à la dissociation dans l'eau, par diffusion ce liquide pénétrera à travers le sarcolemme, qui sera ainsi séparé de la substance musculaire rendue visible.

2. On détachera un petit fragment de muscle, ayant séjourné un jour dans le liquide de Müller; on dilacérera sur une lame; on recouvrira d'une lamelle; on colorera au picro-carmin et on montera dans la glycérine.

3. Sur les insectes, il sera intéressant d'étudier les muscles striés. Il suffit de détacher les faisceaux musculaires des ailes d'un coléoptère, hanneton, hydrophile, etc., de dilacérer dans le sérum artificiel de Kronecker. On colore par l'hématoxyline, le picro-carmin, l'acide carminique, etc., et on monte dans le baume ou la glycérine. On soumettra le muscle ainsi détaché et dilacéré à l'action de l'acide osmique, puis on suivra la marche du tableau I. Pour les temps à accorder à chaque réaction, on se guidera sur l'exercice 1.

4. Pour se rendre compte de la façon avec laquelle un muscle est attaché à un tendon, on traiterait par la potasse à 40 p. c. (Weismann).

Muscles lisses. — En opérant sur la vessie de la grenouille comme nous l'avons indiqué au tableau I, exercice 2, on obtiendra des préparations sur lesquelles on verra les fibres musculaires lisses. Sur des coupes d'intestin de la souris, de la grenouille, sur des sections de la peau de ces mêmes animaux, on examinera les fibres lisses.

TISSUS OSSEUX.

On achètera quelques préparations de tissus osseux et on en fera l'étude en se servant des descriptions des traités d'histologie. Cependant, il sera possible d'obtenir de bonnes préparations de ce tissu en enlevant les frontaux chez de jeunes passereaux (moineaux, pinsons, etc.), au moment où ils vont sortir de l'œuf ou quelques jours après l'éclosion. Ces os sont très minces à cette époque de la vie du petit oiseau. On fera plusieurs préparations en détachant les

fragments de façon à obtenir des surfaces bien planes. On traitera par divers réactifs : acide osmique, chlorure d'or, acide nitrique, etc. On colorera et on montera les préparations les unes dans le baume, les autres dans la glycérine. Il est à remarquer que l'on a ainsi du tissu osseux en voie de formation, ce qui présente un grand intérêt.

Pour préparer les os secs, on coupera avec une scie à l'aide de laquelle on fabrique des ouvrages de fantaisie, une mince plaque de 1 à 2 centimètres de surface. On choisira un fémur, sur lequel on sciera des lamelles, soit longitudinalement, soit transversalement. Sur un porte-objet, on fixera la mince plaque osseuse à l'aide du baume de Canada, que l'on aura chauffé quelque temps, pour le rendre ainsi plus dur. Sur une lame de fer ou de verre dépoli, mouillé avec de l'eau tenant en suspension de l'émeri fin, on usera la lamelle osseuse attachée au porte-objet. A mesure que l'épaisseur diminuera, on arrosera d'eau tenant en suspension de l'émeri de plus en plus fin. Quand, à travers la préparation, on pourra lire des caractères d'imprimerie, on chauffera le porte-objet; à l'aide d'une aiguille, on transportera la lamelle osseuse obtenue par l'usure sur un autre porte-objet, sur lequel se trouvera un peu de baume ordinaire. On recouvrira d'une lamelle enduite de baume.

TISSU NERVEUX.

Préparation du cerveau et de la moelle. — Sur une souris, on détache, avec des ciseaux, la boîte cranienne en prenant soin de ne pas endommager la masse nerveuse. On enlève le cerveau, que l'on fait macérer pendant 24 heures dans le

liquide de Müller, puis 36 heures dans le liquide d'Erliki. On lave à l'eau. On suit la marche des opérations renseignées dans le tableau VII, à partir de B inclusivement, en observant les durées pour les réactions, comme il a été indiqué au début des exercices (page 358) pour le têtard de grenouille.

On détachera de même, sur une longueur de 5 mm., la moelle épinière du même animal. On fera agir le liquide de Müller (24 heures), d'Erliki (36 heures), puis, on traitera en suivant la marche du tableau VII, en commençant par B et en observant les mêmes durées que s'il s'agissait du lombric des jardins (exercice 1, p. 238).

Nous avons indiqué comment on inclurait un cerveau de grenouille dans la celloïdine (voir l'exercice indiqué à la fin du tableau VI). Quant au tableau IV, il représente la marche à suivre pour inclure la moelle de souris dans le savon.

Nerfs. — Pour étudier les nerfs, on les traitera par l'acide osmique au $^1/_{100}$. On laissera agir pendant 24 heures, à l'abri de la lumière. On dilacérera ensuite, puis on montera dans la glycérine.

Cellules nerveuses. — Pour dilacérer les cellules nerveuses, on fera macérer un fragment du cerveau de souris ou de grenouille dans l'alcool $^1/_3$, le sérum iodé ou le bichromate de potassium. On dilacérera, puis on traitera par les différents alcools. On colorera et, enfin, on montera dans la glycérine ou le baume, en suivant la marche du tableau I.

PEAU.

On fera des préparations de la peau de grenouille comme nous l'avons renseigné à la suite du tableau VII, exercice 3.

Pour la peau humaine, on traitera un très petit fragment de peau (2 à 3 mm. de côté) par l'acide osmique à $^1/_{1000}$; on laissera agir 24 heures à l'abri de la lumière; on lavera à l'eau distillée quelques instants, puis, on suivra la marche du tableau VII comme il est indiqué pour la peau de grenouille. On pourrait également suivre la marche du tableau II ou du tableau III.

TUBE DIGESTIF.

L'œsophage, l'intestin, l'estomac de la souris et de la grenouille seront traités suivant le tableau VII. Quant aux durées des réactions, on prendra pour base les temps indiqués pour l'exercice 1 à la suite de ce tableau.

POUMON, FOIE, PANCRÉAS, REIN.

On préparera ces organes entiers en les prenant chez la souris et en les soumettant au liquide de Müller, additionné de 3 grammes d'acide chromique par litre. On lavera à l'eau, puis on passera aux différents alcools, et on suivra la marche du tableau VII, en laissant dans chaque liquide un temps en rapport avec le volume de la pièce.

COEUR.

Traiter un cœur de souris ou de grenouille par l'acide chromique à $^3/_{1000}$ (24 heures). On continuera la marche des opérations comme nous l'avons indiqué pour le cerveau du même animal et le têtard de grenouille.

ORGANES GÉNITAUX.

Nous avons déjà vu comment on étudierait l'ovaire.

Flemming recommande, pour étudier les ovaires de mammifères et les vésicules de Graaf : 1° une solution à 2 p. c. d'acide osmique ; 2° une solution d'acide chromique, d'acide osmique et d'acide acétique. Pour teindre les coupes, il préconise la safranine et le violet de gentiane. *(Arch. f. Anat. u. Phys.,* 1885.)

Les spermatozoïdes s'étudient vivants, en dilacérant un fragment du testicule d'une souris, ou d'une grenouille, ou d'un verre de terre dans le sérum artificiel. A la suite du tableau I, nous avons renseigné comment on procéderait pour obtenir des préparations de spermatozoïdes.

Pour ce qui est de la texture du testicule, on détachera ces glandes chez une souris ou une grenouille. On traitera par le liquide d'Erliki, et on procédera ensuite comme s'il s'agissait d'obtenir les coupes du têtard.

ORGANES DES SENS.

Nous avons déjà vu comment, en coupant un têtard de grenouille, on obtiendra des préparations de l'œil et de l'oreille interne. Ces préparations montrent d'une façon remarquable tous les détails nécessaires pour étudier l'histologie de ces deux organes. Pour obtenir des coupes de la rétine humaine ou d'un autre mammifère, plusieurs moyens ont été préconisés. La fixation a lieu par l'acide osmique à $^1/_4$ p. c., ou bien encore par l'alcool très dilué. On colore

par le picro-carmin, et on inclut dans la paraffine ou la celloïdine.

Pour obtenir des préparations d'yeux entiers, nous extrayons l'embryon de l'œuf de pigeon ou de moineau quelques jours avant l'éclosion. Nous enlevons la tête et nous la plaçons 24 heures dans l'acide chromique à $^{3}/_{1000}$. Nous suivons ensuite la marche du tableau VII comme nous l'avons indiqué pour le têtard de grenouille. Les yeux sont parfaitement conservés, et tous les détails de structure peuvent s'observer.

Quant à la langue, on prendrait cet organe chez une souris, on la traiterait par l'acide osmique à $^{1}/_{1000}$, puis on achèverait les opérations suivant le tableau VII, exercice 1.

DIVISION DES CELLULES ET LA KARYOKINÈSE.

C'est sur des larves de triton et de salamandre que l'on étudiera le mieux les phénomènes de la division des cellules. Dans notre pays, les salamandres mettent les petits au monde dans les flaques et les petits ruisseaux aux mois d'avril et de mai. Jusque vers le milieu du mois de juin, on rencontre encore dans les mares les petites larves avec leurs branchies externes. Elles se cachent sous les pierres, dans les herbes. Dans l'état d'immobilité, elles ont l'aspect de petits coins en bois d'un noir verdâtre; elles mesurent de 20 à 30 mm. de longueur. On les entretient en vie dans les aquariums en leur donnant de petits vers, des *Tubifex,* par exemple, ou encore des larves de diptères. Quant aux *Tritons cristatus,* les larves se trouvent dans les ruisseaux des prairies aux mois de juin et de juillet. Au mois de mai, en

élevant des tritons mâles et femelles dans des aquariums, en les nourrissant de lombrics, on obtient des œufs qui sont ovoïdes, jaunâtres, et entourés d'une couche transparente d'albumine. Bientôt, il en sort de petits têtards, que l'on nourrira aussi de *Tubifex rivulorum*. Ces vers rougeâtres filamenteux vivent en amas compacts d'un rouge vif dans les ruisseaux boueux.

Aux larves de salamandre ou de triton, on détachera les branchies et la queue; on les traitera par la formule de Flemming ou de Rabb (pp. 196 et 197). Pour la coloration, on tiendra compte de la méthode de Flemming et Hermann (p. 228).

En ouvrant des larves de salamandre et de triton, on voit flotter, dans la région thoracique, deux tubes argentins; ce sont les poumons en voie de formation. On les détachera et on les étalera en les ouvrant sur le porte-objet dans le liquide de Kronecker.

Sans faire subir aucune préparation, il sera possible de voir les figures karyokinétiques des noyaux en voie de division.

Dans les poumons du têtard de grenouille, à certain moment, on peut observer également les mêmes phénomènes. La vessie de très jeunes grenouilles offre encore le moyen d'étudier les phénomènes qui se passent dans les noyaux lorsqu'ils se divisent. Pour obtenir des préparations définitives, on procédera comme nous l'avons indiqué ci-dessus. Nous rappelons également que lorsque nous avons décrit les réactifs, nous avons, à diverses reprises, signalé quels étaient les agents convenables pour étudier les noyaux et leurs transformations.

Sur des coupes de larves de salamandre et de triton, on obtiendra également de bonnes préparations de cellules en voie de division en procédant comme nous l'avons indiqué dans les débuts de ces exercices.

Nous pensons que les sujets à préparer que nous venons de faire connaître sont suffisants pour que l'étudiant puisse maintenant travailler seul et procéder à l'examen de n'importe quel organe. En réalisant toutes les préparations que nous avons indiquées, on aura acquis assez d'expérience pour travailler sans guide.

II

EXERCICES D'EMBRYOLOGIE.

Se rendre compte par l'observation directe des phénomènes de transformation par lesquelles un être passe successivement, assister en quelque sorte à l'édification d'un organisme, n'y a-t-il pas là de quoi intéresser au plus haut point l'étudiant. Mais, objectera-t-on, il y a de grandes difficultés; pour les surmonter, il faut une habileté exceptionnelle ! On croirait vraiment que les personnes qui tiennent pareil langage ont reçu pour mission de rendre tout difficile, comme si elles s'ingéniaient à éloigner le plus de monde possible des études pratiques. On nous a demandé souvent des conseils sur les moyens d'étudier l'embryologie; nous répondons : Faites couver des œufs de poule, ouvrez-les sous l'eau à une température de 38°, détachez le blastoderme, et sans faire aucune préparation, examinez au microscope ; vous en saurez ainsi beaucoup plus qu'en étudiant théoriquement n'importe

quel cours élémentaire d'embryologie. Sans doute, si vous consultez en procédant ainsi un traité sur la matière, le travail vous sera singulièrement facilité : nous croyons qu'un livre, pour servir de guide, est nécessaire; mais le livre seul ne peut vous faire connaître les choses telles qu'elles existent réellement. Nous affirmons que les exercices d'embryologie sont absolument indispensables pour se faire une idée suffisamment exacte des phénomènes, et *ces exercices sont à la portée de tous*. Nous avons initié bon nombre de personnes à la pratique de cette science, et les résultats obtenus, dès le principe, nous permettent d'affirmer ce que nous avançons ci-dessous.

EMBRYOLOGIE DU POULET.

Incubation. — Pour l'incubation des œufs, ce qu'il y aurait de mieux, ce serait de la faire produire naturellement par la poule. Mais il est peu probable que l'on puisse avoir recours à ce moyen dans la plupart des cas. Il existe de nombreux appareils incubateurs; le prix élevé ne les rend pas abordables aux débutants. On fera donc construire une étuve à eau, pareille à celle que l'on emploie dans les laboratoires de chimie. Cet instrument, d'ailleurs, est d'une grande utilité dans la technique. Il remplace le bain-marie pour les inclusions dans la paraffine; il sert avantageusement pour évaporer l'essence de girofle quand on fixe les coupes par la méthode de Schällibaum; on y sèche les préparations montées au baume liquide.

Les dimensions qui nous paraissent convenir le mieux sont les suivantes : hauteur, 25 cm; largeur, 25 cm.; hau-

teur, 20 cm. Entre la paroi interne et la paroi externe, on laissera une distance de 3 1/2 cm.

Deux tubulures seront appliquées à la face supérieure; l'une traversera de part en part les deux caisses, de façon à faire communiquer la chambre intérieure avec l'air externe. L'autre tubulure ne traversera que la paroi externe; elle fera communiquer l'espace compris entre les deux parois avec l'extérieur. Dans cette tubulure sera fixé un thermomètre. On doit recommander au constructeur d'appuyer convenablement la caisse interne pour qu'elle ne s'affaisse pas sous le poids de son contenu.

Fabriquée en fer-blanc et munie d'une petite porte, l'étuve que nous venons de décrire ne doit pas coûter plus de 10 à 12 francs.

En vue de diminuer le prix, on adopterait la forme cylindrique. Un cylindre externe en fer-blanc, de 25 cm. de diamètre et de 30 cm. de haut, contient un autre cylindre de 19 cm. de diamètre et de 25 de haut, de telle sorte que tous les points du premier soient à 3 cm. du second. Une couronne circulaire unit les deux cylindres par leurs bords supérieurs. Dans cette couronne sont adaptés deux tubulures pour verser l'eau dans l'espace entre les deux cylindres et pour fixer le thermomètre. Le cylindre interne est fermé supérieurement par un couvercle. L'appareil que nous venons de décrire coûtera au plus 7 francs.

Que l'on emploie l'une ou l'autre de ces étuves, il est indispensable qu'elles soient entourées de toute part de feutre ou de drap épais. Une simple veilleuse à l'huile grasse suffit pour maintenir la température entre 38° et 40°. Après quelques tâtonnements, on trouvera la hauteur à laquelle il

faut placer la veilleuse pour obtenir une température constante.

On prendra le récipient très large, afin que la hauteur de l'huile ne diminue pas trop en se consumant. Une veilleuse bien réglée marche pendant 12 heures sans que l'on ait à s'en inquiéter. Après un jour ou deux, on sera fixé sur la façon de procéder.

Quand on pourra disposer du gaz, les lampes perfectionnées munies de régulateurs donneront des températures constantes sans le moindre inconvénient.

EXAMEN D'EMBRYONS DE POULET DE 30 A 40 HEURES.

Les embryons de 30 à 40 heures sont faciles à enlever de l'œuf : on commencera donc par ces âges. Voici comment on procédera : l'œuf sera retiré de la couveuse, et alors qu'il est encore chaud, on pratiquera une ouverture dans la grosse extrémité ; puis, plongeant l'œuf entier dans un baquet contenant du liquide de Kronecker à une température de 38°, on coupera, avec de fins ciseaux à pointes émoussées, la coquille suivant un grand méridien, de façon à enlever à peu près exactement la partie supérieure. On écartera l'albumine avec des pinces et on isolera complètement le jaune. Le blastoderme apparaîtra toujours au pôle supérieur du jaune. Avec de fins ciseaux, on le coupera sans entamer l'aire vasculaire. Quand il sera complètement isolé, on l'attirera avec des pinces dans un verre de montre; on l'étalera avec soin; on agitera doucement le liquide, s'il reste du jaune attaché au blastoderme.

On examine d'abord au microscope simple, puis, au

microscope composé, en se servant d'objectifs donnant de 30 à 50 diamètres.

On maintiendra, pendant l'observation, la température à 38°. On dessinera, en s'aidant de la chambre claire, tout ce que l'on voit.

Pour obtenir des préparations définitives d'embryons depuis 18 jusque 50 heures, on suivra la marche du tableau I.

Le blastoderme entier sera attaché avec de très fines épingles dans un baquet à fond de cire et soumis ainsi, parfaitement étalé, aux différents réactifs.

B*c* liquide de Kleinenberg, 1 à 2 heures; — C*a*, C*b*, 15 minutes dans chaque liquide; — C*c*, changer l'alcool à 90° jusque disparition de toute coloration jaunâtre d'acide picrique.

D, colorer au picro-carmin, 3 heures; décolorer légèrement à l'alcool à 45°, contenant pour 30 c/c, 5 gouttes d'acide chlorhydrique; surveiller avec soin la décoloration.

E*a*, E*b*, chacun 15 minutes. — E*c*, 30 minutes. — F^2, 30 à 60 minutes. — G^2, environ dix minutes, surveiller la clarification.

H^2. — L'embryon est transporté, à l'aide d'une spatule (fig. 87), sur une lame recouverte d'une mince couche de baume dissout dans la térébenthine; on dispose la lamelle enduite de baume comme à l'ordinaire.

Contrairement à ce que disent Forster et Balfour dans leurs *Éléments d'embryologie*, nous croyons qu'une série d'embryons entiers, depuis 18 jusque 50 heures, préparés comme nous venons de l'indiquer, a une réelle valeur et que ce qu'elle montre est suffisamment intéressant pour qu'on se donne la peine de les préparer.

Au-delà de 50 heures, il devient assez difficile de monter des blastodermes en préparations définitives. Mais il est indispensable de les étudier sous le microscope en les maintenant vivants, comme nous l'avons indiqué.

Entre trois et quatre jours, l'aire vasculaire a atteint des dimensions considérables. Il est intéressant d'observer alors l'embryon muni de cette annexe pour connaître comment la circulation s'opère. On coupera l'aire vasculaire sans l'entamer pour la séparer du jaune; la difficulté n'est pas bien grande, si l'on a soin de maintenir à l'aide de fines pinces à mesure que l'on incise avec des ciseaux. La séparation terminée, on amène l'embryon dans un grand verre de montre et on étale convenablement. Ces manipulations doivent se faire à la température de 38° à 39° et dans le sérum de Kronecker. On observera au microscope simple et composé, toujours sous de faibles amplifications; pendant l'examen, on maintiendra la température en 38° et 40°, en se servant d'une platine chauffante ou bien en chauffant doucement quand le liquide se refroidit trop. Les mouvements du cœur diminuent à mesure qu'il y a refroidissement; ils augmentent quand la température monte; on pourra se guider sur ces phénomènes de pulsation ; on se servira également d'un thermomètre. On maintient facilement un embryon en vie en procédant, comme nous venons de l'indiquer, pendant plus de deux heures.

On coupera des embryons de tous les âges, en les enrobant dans la paraffine. On rangera les coupes en séries à l'aide de l'une ou l'autre des méthodes de sériation que nous avons renseignées. La méthode de Threlfall est recommandable et rapide, surtout si l'on colore en masse, ce qui réussit très bien avec les embryons de poulet.

Dans la plupart des cas, on inclura donc dans la paraffine en suivant la marche du tableau VII. L'exercice quatrième qui suit ce tableau renseigne comment il faut s'y prendre pour couper des embryons de 30 à 50 heures. Pour des âges moindres, on diminuera la durée des réactions suivant les dimensions des embryons.

En A, on choisira, pour les cas ordinaires, le liquide de Kleinenberg; en B, on se servira du carmin picrique.

Tous les exercices que nous venons d'indiquer peuvent également se faire sur des œufs de pigeon. L'incubation artificielle aura lieu également comme nous l'avons indiqué pour les œufs de poule.

Nous recommandons aussi l'étude des œufs d'oiseaux plus petits, tels que le moineau, le serin, le roitelet, l'hirondelle, etc.

Nous croyons qu'il y a là des choses intéressantes à découvrir. A cause des dimensions moindres du blastoderme et de son extrême transparence, il sera plus aisé de procéder à une étude complète.

En vue de faire l'étude des tissus et des organes, tels que l'œil, l'oreille, les poumons, le foie, etc., nous conseillons vivement de prendre les plus petits œufs d'oiseaux possible, au moment de l'éclosion ou un jour ou deux avant. On les traite exactement de la même façon que le têtard de grenouille pour les inclure dans la paraffine et les débiter en coupes.

Sur de petits œufs entiers, il sera facile d'obtenir des coupes entières du jaune, soit que l'incubation ait eu lieu déjà, soit que l'on veuille connaître la structure avant que ce phénomène ait commencé. Voici le moyen qui nous a

toujours réussi. Dans le liquide de Kronecker, nous enlevons la moitié supérieure de la coquille; nous séparons le jaune de l'albumine; puis, replaçant le jaune dans l'autre moitié de la coquille, de façon que la cicatricule se trouve au pôle supérieur, nous immergeons le tout dans l'acide chromique à $^3/_{1000}$.

Cette façon de procéder est nécessaire, car si le jaune vient à rouler, il n'est plus possible d'orienter convenablement par la suite la cicatricule. Pour de petits œufs, on laisse réagir pendant trois jours l'acide chromique. On lave à l'eau et on passe aux différents alcools de six en six heures; on laisse durcir convenablement dans l'alcool à 90°. On inclura dans la celloïdine en suivant la marche du tableau VI. La méthode de Calberla et Ruge nous a donné dans l'étude de petits œufs entiers d'excellents résultats.

On peut également employer la paraffine, mais il faut alors faire usage du chloroforme en E^2a, E^2b et F^2 (tableau VII). Les résultats sont moins satisfaisants que par la celloïdine et l'albumine.

Les œufs des reptiles, lézards, couleuvres, etc., s'étudient comme les œufs des oiseaux. Il est évident que, pendant l'observation, il n'est pas nécessaire d'élever la température.

Outre les procédés que nous venons de passer en revue, nous trouvons utile de faire connaître comment Kupffer traite les *œufs méroblastiques. (Arch. f. Anat. und physiol., 1882.)* Les œufs sont enlevés des oviductes que l'on ouvre dans une dissolution à 0,1 pour cent d'acide osmique. L'albumine est séparée autant que possible. L'acide osmique est enlevé et remplacé par une dissolution à $^1/_3$ pour cent d'acide chromique; on laisse agir vingt-quatre heures.

L'aire germinale est coupée à son extrême limite, et en faisant flotter, on enlève complètement le jaune. Ce dernier et l'acide chromique sont enlevés, puis on lave à l'eau. On transporte dans le liquide de Calberla (égale partie de glycérine et d'alcool absolu). On durcit par l'alcool et on teint par le carmin acétique (vingt-quatre heures). — On peut ensuite procéder comme à l'ordinaire pour inclure dans la paraffine.

Le même auteur conseille de préparer les œufs de poissons comme suit : *a)* acide chromique ($^1/_3$ pour cent), vingt-quatre heures; *b)* eau distillée, deux heures; les membranes des œufs sont maintenant facilement enlevées; *d)* laver à l'eau distillée; *e)* alcool absolu, glycérine et eau distillée en parties égales, quatre heures; *f)* alcool absolu; *g)* carmin acétique, un à deux jours; *h)* solution d'eau et de glycérine en quantité égale additionnée de $^1/_2$ pour cent d'acide chlorhydrique, quelques minutes; *i)* lavage à l'eau, quatre à cinq heures; alcool absolu, douze heures; *k)* préparer pour inclure dans la paraffine. Les figures karyokinétiques se montrent très distinctement.

EMBRYOLOGIE DES BATRACIENS.

Au mois d'avril, on se procure des œufs de grenouille au moment de l'éclosion. On en rencontrera en abondance à cette époque flottant à la surface de tous les ruisseaux dans les prairies. Déposés dans des aquariums, les petits têtards ne tarderont pas à éclore; le développement marche d'autant plus activement que la température est élevée.

Pour l'étude de la segmentation, nous conseillons de

séparer les œufs de l'albumine qui les entoure en dilacérant; il ne faut pas s'inquiéter des derniers fragments d'albumine qui pourraient encore y adhérer. On fait réagir une des solutions de Flemming comme il est indiqué à la page 196 (A et B) et en suivant les manipulations recommandées.

On inclut dans le savon, la celloïdine ou l'albumine par la méthode de Calberla. La paraffine donne des préparations moins satisfaisantes.

Comme moyen de fixation, le chlorure mercurique et l'acide chromique sont également recommandables. Quant aux petits têtards, on les traitera par l'acide osmique à $^1/_{1000}$ en laissant réagir quelques minutes; puis on les soumettra aux différents alcools. Le liquide de Müller et le liquide d'Erlicki additionnés par litre de trois grammes d'acide chromique fixent également très bien. On laissera réagir vingt-quatre heures; puis, avec une spatule, on transportera dans de l'eau pour enlever l'excès des réactifs précédents. On passera de six en six heures dans les différents alcools. On colorera en masse par le picro-carmin ou une solution colorante alcoolique; il faut, en moyenne, un jour pour que la teinte soit convenable. On continuera les opérations suivant le tableau VII, comme il est indiqué au premier exercice pour le ver de terre.

On peut ainsi se faire toute une collection d'embryons de grenouille, que l'on conservera intacte dans l'alcool absolu jusqu'au moment de les préparer. En étudiant les embryons de grenouille comme nous venons de l'indiquer, et en pratiquant des coupes transversales et longitudinales, on pourra se rendre compte de la formation du système nerveux, de la corde dorsale, des yeux, des oreilles, etc., comme sur

n'importe quel embryon de mammifère. Si le débutant rencontrait des difficultés matérielles dans la préparation des embryons d'oiseaux, ici ces obstacles n'existent plus; l'incubation se produit seule, l'embryon ne doit subir aucune manipulation préalable, enfin, ce qui doit être pris en considération, les frais sont nuls. Aussi, nous recommandons, si la saison s'y prête, de commencer par cette étude. Ce que nous venons de dire s'applique également aux œufs des différentes espèces de tritons. Remarquons, pour terminer, que dans le courant de l'été, il n'est pas rare de rencontrer des œufs de batraciens dans les ruisseaux; certaines espèces pondent tard; souvent même quelques grenouilles donnent leurs œufs à des époques tardives.

Quant à la fixation, le durcissement, la coloration et l'inclusion dans la paraffine, toutes ces réactions se produisent ici avec la plus grande facilité. Faisons remarquer que ce sont les embryons les plus jeunes qui présenteront le plus d'intérêt.

Les œufs de poissons et les embryons de ces animaux se préparent comme nous venons de l'indiquer pour les batraciens. L'épinoche peut être élevé dans des aquariums; il n'est pas difficile d'en obtenir des œufs et des embryons.

EMBRYOLOGIE DES INVERTÉBRÉS.

En élevant des sangsues dans les aquariums, elles donneront tout l'été des œufs qu'elles attacheront aux plantes aquatiques. Ces œufs sont inclus dans une masse gélatineuse protégée par une plaque cornée brunâtre.

Les œufs sont enlevés et séparés de la substance albuminoïde. On les trouvera à tous les états de divisions, depuis

la première segmentation en deux cellules jusqu'à l'individu complètement développé. La segmentation peut être suivie sur le porte-objet. Pour des préparations définitives, on suivra la marche du tableau I (exercice 1).

La clepsine, une hirudinée commune dans les eaux douces, porte les œufs sous le ventre dans une vésicule spéciale; il sera donc facile de se procurer là les œufs. On les étudiera comme nous venons de l'indiquer pour la sangsue.

Dans le poumon et le tube digestif de la grenouille, on rencontre plusieurs espèces d'ascaris qu'il suffit de dilacérer pour voir sur les œufs les premiers phénomènes de la segmentation. En soumettant ces œufs aux réactifs et à la méthode du tableau I, on obtiendra des préparations définitives.

Le savant et illustre professeur d'embryologie de l'Université de Liège, M. Van Beneden, dans son beau travail intitulé : *Recherches sur la maturité de l'œuf et la fécondation,* a étudié les premiers phénomènes qui se produisent dans l'œuf de l'*Ascaris megalocephala*. A la page 277 de ce mémoire, on lit : « *J'ai trouvé dans l'ascaride du cheval un matériel admirable, et je suis convaincu que les œufs de ce nématode deviendront bientôt l'objet classique pour l'étude et la démonstration des phénomènes qui se rattachent à la fécondation.* A la page 279, on trouve détaillées avec soin les méthodes mises en œuvre pour arriver aux résultats. Nous engageons vivement l'étudiant à préparer les œufs de l'ascaride du cheval en suivant les indications de M. Van Beneden, et à lire en même temps le travail de cet auteur sur le sujet qui nous occupe. En procédant de la sorte, le débutant pourra se rendre compte de la façon employée par

les auteurs quand ils étudient une question. En dessinant les préparations que l'on obtiendra, et en les comparant aux planches des figures originales, on acquerra bien vite l'habileté si nécessaire de pouvoir représenter ce que l'on voit au microscope.

Les œufs des arthropodes s'étudieront soit en les coupant, soit encore, comme nous venons de l'indiquer, en les préparant sur le porte-objet suivant le tableau I.

Un sujet d'étude intéressant est ce petit crustacé si commun dans les eaux douces et qui ressemble au cloporte, nous avons nommé l'*aselle*. Sous le ventre, on trouve chez ce petit animal, que l'on élève si facilement dans les aquariums, des œufs à tous les stades de développement. Les œufs de mollusques, que l'on rencontre en masses gélatineuses dans les eaux douces, se prêtent également bien à l'étude; on les sépare de la masse albuminoïde, et on les soumet aux réactifs comme il est indiqué au tableau I.

Nous croyons avoir indiqué suffisamment de sujets pour que le débutant soit maintenant au courant des méthodes employées en embryologie pratique.

III

EXERCICES DE ZOOLOGIE ET D'ANATOMIE COMPARÉE.

PRÉPARATION DES PROTOZOAIRES.

Dans le tableau I, exercice 1, nous avons fait connaître la marche à suivre pour préparer les infusoires. Nous avons vu, page 229, que Henneguy, par le brun de Bismarck en solution très diluée, colorait le *Paramœcium aurelia*. Avant

cet auteur, M. Certes avait coloré, par le bleu de quinoléine, les infusoires vivants; la solution était pour cela étendue à $^1/_{100000}$. Les méthodes employées pour fixer et colorer les infusoires sont nombreuses. M. Certes use de l'acide osmique; Korscheld, de l'acide chromique et osmique; Kleinenberg, de l'acide picro-sulfurique. Le D[r] H. Blanc *(Zool. Anzeiger*, 1883) emploie la solution suivante : acide picrique en solution concentrée, 100 volumes; acide sulfurique, 2 volumes; eau distillée, 600 volumes. Cette solution peut être employée avec les larves d'échinodermes, de méduses, d'éponges, etc. Pour les infusoires, il recommande d'ajouter deux ou trois gouttes d'acide acétique pour 15 c/c du liquide précédent. Par là, il apporte de la transparence en éclaircissant les noyaux et les nucléoles. L'organisme est ainsi parfaitement tué et la coloration se produit facilement et rapidement. On sait qu'après l'acide osmique, la coloration est lente et irrégulière.

Le D[r] Blanc, comme nous l'indiquons dans le tableau I, fixe les infusoires sous la lamelle, malgré les recommandations contraires de Landsberg. Après l'acide picro-sulfurique, il traite par l'alcool à 80 p. c. et il lave jusqu'à disparition de la couleur jaune. Pour teindre, il emploie la safranine ainsi préparée : 5 gr. sont dissous dans 15 gr. d'alcool absolu ; après quelques jours de repos, on filtre et on ajoute $^1/_2$ volume d'eau distillée. Cette solution est préférable au picro-carmin. Après coloration, on lave à l'alcool absolu qui dissout en partie la safranine, mais celle-ci reste suffisamment fixée sur les noyaux : on clarifie par l'essence de girofle et on ajoute du baume liquide, comme il est indiqué au tableau I.

Max Schultze et Certes ont imaginé un procédé qui consiste à fixer les infusoires par les vapeurs d'acide osmique; sur une lame, ils placent dans une goutte d'eau les infusoires à préparer. Puis ils déposent sur l'embouchure d'un flacon d'acide osmique à 2 p. c., de façon que la goutte, contenant les infusoires, soit suspendue au-dessus du flacon. Les animaux sont instantanément fixés. On achèverait les opérations comme au tableau I.

Pour fixer les infusoires, Cattaneo *(Bolletino scientifico, 1885)* emploie une solution de chlorure de palladium dans l'eau; en quelques minutes, les organismes sont momifiés sans qu'ils subissent de modification dans leur forme; il n'y a pas non plus de noircissement dans le protoplasme.

Le chlorure double d'or et de cadmium, d'après le même auteur, agit encore mieux; quant à l'iodure double de potassium et de mercure (1 à 2 p. c.), il sert à étudier le réseau protoplasmique. Avec le sublimé à 5 p. c., de belles préparations sont obtenues; ce réactif tue les infusoires instantanément et les fixe après quelques moments. Le nitrate d'argent est également préconisé à 1 p. c. Il est nécessaire de laver ensuite au sulfate acide de soude. Quant à la coloration, Cattaneo dit que c'est le picro-carmin qui doit être préféré; enfin, pour monter les préparations, il recommande la glycérine et l'huile de girofle.

En étudiant la famille des tintinnodea *(Arch. sc., phys. et nat., 1885)*, Fol a trouvé qu'avec l'acide osmique faible, les cils du péristome de ces infusoires ne sont pas préservés; à une forte concentration, il y a une grande contraction; quant aux acides acétique, chromique, picro-sulfurique, ils donnent des fixations lentes, et toujours l'animal est con-

tracté. Aussi, le savant professeur de Genève a-t-il rejeté ces réactifs pour les remplacer par le perchlorure de fer, qui fixe les spécimens en les laissant complètement étalés. Les animaux sont ensuite lavés à l'alcool, puis traités par l'acide gallique. On obtient ainsi une coloration brune, qui est localisée spécialement sur les noyaux; ces derniers sont rendus visibles de cette façon. Les autres parties de l'animal se colorent aussi en brun moins foncé. On monte dans le baume après avoir, au préalable, déshydraté et clarifié.

Sujets d'études. — Pour se procurer des infusoires, des rhizopodes, des bryozoaires marins, Möbius fixe des porte-objets dans une pièce en bois en y sciant des rainures pour glisser ainsi les lames de verre. La pièce de bois est clouée à une perche; le tout est disposé dans le port de façon que les porte-objets soient à quelques pieds sous l'eau de la mer. Pour l'étude, les lames de verre sont retirées du bois et fixées sur un fragment de liège; on les fait flotter dans un vase contenant de l'eau de mer, de façon qu'elles soient immergées complètement. Dans les aquariums, pour obtenir les infusoires et les rhizopodes qui s'y trouvent pour l'examen immédiat, Möbius recommande de faire flotter des lames de verre par l'intermédiaire de fragments de liège *(Zool. Anzeig., 1885)*.

Le Dr Blanc a fait connaître une méthode analogue à celle de Möbius pour recueillir des rhizopodes d'eau douce. Il descend au fond de l'eau une grande croix de St-André, aux quatre extrémités de laquelle il attache des fragments de glace très épaisse. Après trois ou quatre semaines, il amène le tout à la surface et il recueille la boue fine qui s'est déposée sur les lames de verre en l'enlevant avec une

brosse. Les animaux cherchés se trouvent dans cette boue *(Bul. Soc. Vaudoise, sc., nat., 1885).*

Pour recueillir des rhizopodes et des infusoires, il suffit de retirer des pièces d'eau, rivières, mares, etc., des fragments de bois, des pierres, et d'enlever avec une brosse la boue qui y est déposée en frottant la surface.

On étudiera d'abord les infusoires parasites dans l'intestin de la grenouille.

A la suite du tableau I, exercice 1, nous avons fait connaître comment on obtient des préparations définitives de ces protozoaires. Mais pour un examen approfondi, il sera nécessaire de voir ces animaux vivants et de les soumettre aux différents réactifs que nous venons de passer en revue et qui ont été employés par des auteurs compétents. Il y aurait également un grand intérêt à suivre sur le porte-objet le développement de ces infusoires.

En faisant macérer du foin pendant quelques jours dans de l'eau, on obtient en abondance le *Paramœcium aurelia.* Ces infusoires, comme l'opaline de la grenouille, se voient à l'œil nu si on les observe dans un vase en verre convenablement éclairé. On les saisira avec la pipette, représentée par la figure 4; on les transportera sur un porte-objet. On les étudiera vivants; puis on les préparera par l'un ou l'autre des réactifs qui ont été préconisés pour cet usage et en suivant la marche du tableau I, exercice I.

Les phénomènes de reproduction, scissiparité, conjugaison, etc., peuvent être suivis avec la plus grande facilité chez le Paramœcium. Quand, sur un porte-objet, on aura obtenu différents stades de ces phénomènes, on les préparera définitivement en employant la marche du tableau I.

En faisant macérer dans l'eau des mouches, on obtient des vorticelles que l'on fixera à l'acide osmique en le laissant tomber alors que l'on examine ces animaux au microscope simple. Le réactif fixateur ne sera déposé que quand les infusoires seront étalés.

On trouve dans l'intestin du têtard du *Pelobates,* une amibe qui présente le plus grand intérêt. Ce protozoaire n'a jamais été décrit. Nous l'avons trouvé pour la première fois en 1876; diverses raisons nous ont empêché de faire connaître cette espèce nouvelle. L'animal qui nous occupe est animé de contractions amœboïdes très prononcées et très rapides; des courants de liquides se font d'une façon très régulière et très remarquable; enfin, dans l'ectosarc, on trouve un premier noyau, tandis que dans l'endosarc il en existe un second. Nous engageons le débutant à rechercher cette espèce nouvelle qui présente les caractères typiques, pour se faire une idée parfaite de la structure d'une amibe. Ces animaux se préparent définitivement comme il est indiqué au tableau I à partir de B.

L'Amœba terricola, protozoaire également typique, se rencontre dans le sable et la boue que l'on obtient en secouant les mousses attachées aux arbres et aux murs. Pour les observations et la préparation, voir ce qui est indiqué plus haut.

Dans le testicule du lombric, on trouve une grégarine, le *Monocystis agilis,* que l'on observera dans le liquide périsviscéral du verre de terre. On enfonce un tube de verre étiré dans la peau d'un lombric; en soutirant doucement, on obtient un liquide dans lequel on dilacérera sur le porte-objet, un fragment de testicule du même animal. En exami-

nant au microscope, on trouvera le *Monocystis agilis* avec ses sporospermies caractéristiques. Observation et préparation comme il est indiqué plus haut.

Deux protozoaires que le débutant se procurera encore facilement se trouvent attachés aux branchies natatoires de la crevette d'eau douce *(Gammarus pulex)*. On sépare ces branchies en enlevant les pattes entières de ce petit crustacé; les lamelles transparentes qui restent attachées à la cuisse du membre sont les branchies.

L'un des infusoires, le *Dendrocometes paradoxus*, est globuleux; il présente un ou plusieurs suçoirs ramifiés et non contractiles de forme arborescente. L'autre est le *Spirochona gemmipara;* il a la forme d'une petite urne. Le péristome est infundibuliforme; on y trouve une spirale caractéristique de cirrhes buccaux. Préparation et observations comme il est indiqué plus haut.

COELENTÉRÉS.

Les hydres d'eau douce se rencontrent sur les lentilles, les plantes aquatiques, les pierres, etc. Deux espèces sont communes dans les ruisseaux, les mares, etc. Pour en trouver sur les cailloux et les herbes, il suffit de retirer ces objets de l'eau et de les examiner avec attention. L'hydre se ramasse en un petit corps gélatineux verdâtre, si l'on a affaire à l'hydre verte, d'un gris brunâtre, si on a affaire à l'hydre grise.

On les élève dans les aquariums en les nourrissant de tubifex.

On étudiera l'hydre en la dilacérant après un séjour de

24 heures dans l'acide chromique à $^1/_{1000}$ ou l'alcool $^1/_3$. On colorera les cellules dilacérées et on les montera dans la glycérine ou le baume comme à l'ordinaire.

On traitera également un certain nombre de sujets parfaitement étalés par une dissolution saturée et bouillante de sublimé; on ne laissera agir que quelques minutes; puis on passera à l'alcool au tiers, dans lequel, par 30 c/c, on aura ajouté 5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré. On transporte successivement dans les différents alcools. On colore par le picro-carmin, et on achève les opérations pour l'inclusion dans la paraffine comme il est indiqué au tableau VII, à partir de D*a* inclusivement; on emploiera E^2 et F^2. Le séjour dans les différents liquides ne doit pas être prolongé, l'animal étant très petit. L'opération C se fait facilement en 20 à 25 minutes. Les autres opérations, quant à leur durée, se produiront facilement. On coupera transversalement d'abord un spécimen; puis longitudinalement un autre.

Quant à la fixation, elle peut s'opérer également à l'acide osmique à $^1/_{1000}$.

En vue d'obtenir une préparation entière de l'hydre complètement étalée sur le porte-objet, on procédera comme nous allons l'indiquer :

Les animaux étant complètement épanouis, tentacules étalés, on remplit une pipette d'acide osmique à $^2/_{100}$; l'extrémité effilée de la pipette contient de l'eau distillée, l'autre extrémité est fermée avec l'index. Les parois externes sont essuyées avec soin; on introduit la pipette de façon que la pointe arrive presque en contact avec l'animal, et cela sans produire de mouvement dans l'eau; dans cette position, on

enlève le doigt de la pipette, et l'acide osmique arrivant en contact avec l'animal le tue sans qu'il se produise de contraction.

VERS.

Plathelminthes. — On récoltera, dans les eaux douces, les turbellariés, qui y sont si communs. On les observera dans les aquariums, où ils vivent fort bien, en se reproduisant même.

Quant aux trématodes et cestodes, on les cherchera surtout dans l'intestin de la grenouille, du crapaud et autres batraciens, ainsi que sur les branchies et dans l'intestin des poissons, soit d'eau douce, soit marins.

Les parasites des poissons marins sont encore en vie quand ces derniers arrivent sur les marchés. On recherchera donc dans les intestins de la raie, de l'esturgeon, du turbot, etc., les cestodes et trématodes qui y vivent en parasites.

Ces animaux seront observés dans l'eau salée à $^1/_{100}$, ou bien encore dans le liquide de Kronecker. On les étudiera, d'abord, par transparence. Un grand nombre de ces plathelminthes sont peu épais et permettent, avec la plus grande facilité, l'observation des différents organes qui composent ces animaux. Les organes sexuels présentent particulièrement un grand intérêt. L'appareil excréteur aussi mérite de fixer particulièrement l'attention. Le Dr Fraipont, professeur à Liège, dans plusieurs Mémoires que l'on trouvera dans les *Archives de biologie*, 1880 et 1881, a étudié et décrit l'appareil aquifère des plathelminthes. Nous engageons

vivement le débutant à examiner l'appareil qui nous occupe sur deux sujets qui se prêtent on ne peut mieux à ces recherches. C'est, d'abord, chez le *Tœnia dispar,* que l'on trouve dans l'intestin de la grenouille et du crapaud, puis, sur le Tœnia que l'on trouve dans l'intestin de l'épinoche. C'est surtout sur ce dernier ver, à cause de son extrême transparence, qu'il sera possible de bien observer l'appareil qui nous occupe.

Pour faire l'étude que nous proposons, il ne faut employer aucun réactif; le ver est placé sur un porte-objet dans de l'eau salée à $^1/_{100}$, on recouvre d'une lamelle, on soutire l'excès de liquide avec un fragment de papier-filtre, de façon que l'animal reste fixé sous le poids de la lamelle sans cependant être écrasé par elle. On porte sous le microscope; on fait, d'abord, l'examen des gros vaisseaux, on en prend un croquis à des grossissements variant entre 100 et 200 diamètres; puis on procède à l'étude des canaux excréteurs plus fins et des entonnoirs vibratiles qui les terminent. Un bon objectif à eau, ou mieux encore un objectif immersion-homogène devra être employé. Peut-être qu'avec les objectifs perfectionnés que nous possédons actuellement, et qui n'étaient pas connus quand les Mémoires cités plus haut ont paru, verra-t-on des choses qu'il n'était pas possible de découvrir avec les outils que l'on possédait il y a six ans. Quoi qu'il en soit, nous avons voulu montrer que, sans employer des méthodes bien difficiles et bien compliquées, il est possible encore de faire des découvertes très intéressantes. Voilà pourquoi nous avons proposé aux commençants les études qui précèdent.

Pour étudier la texture si intéressante des plathelmin-

thes, nous conseillons de choisir le polystome qui vit dans la vessie urinaire de la grenouille à tempes noires.

Ce trématode étant extrait de la vessie, on le place dans un vase à fond plat; on le laisse s'étaler complètement; puis, on lui verse rapidement du chlorure mercurique en solution saturée et bouillante; après quelques minutes, l'animal est complètement blanchi; avec une spatule en bois ou en caoutchouc vulcanisé, on le transporte dans l'alcool au $^1/_3$ renfermant par 30 c/c, 5 gouttes d'acide chlorhydrique; on laisse agir 10 minutes, puis on transporte dans l'alcool $^1/_3$, et on fait parcourir la suite des alcools de deux en deux heures. Après durcissement, on colore par la méthode de Lang (voir *éosine*, page 231).

Après deux jours d'immersion dans le liquide colorant, on lave à l'alcool à 70°; puis, on passe successivement dans les alcools à 90°, 100°, pour durcir et déshydrater. On inclut dans la paraffine en employant comme dissolvant le xylol ou le chloroforme et en suivant la marche du tableau VII. Temps, E^2a, 6 heures; — F^2, 3 heures; — G, 3 heures.

Les autres opérations s'achèvent successivement en montant dans le baume.

Nous attirons l'attention plus particulièrement sur la structure du système nerveux.

Dans les poumons de la grenouille, on trouve en abondance de grands trématodes que l'on soumettrait aux manipulations qui précèdent.

Enfin, deux trématodes, le *Distonium clavigerum* et le *D. subclavatum*, se rencontrent dans l'intestin de la grenouille; on les étudierait par transparence, puis on les cou-

perait en les enrobant dans la paraffine, comme nous venons de l'indiquer pour le polystome.

La texture des animaux que nous venons de nommer est particulièrement intéressante; nous croyons qu'avec un peu de persévérance, on fournirait sans trop de peine des monographies qui ne seraient pas sans présenter de l'intérêt. Pour les renseignements concernant ces animaux, ainsi que pour se faire une idée de la façon par laquelle on dessinera ce que l'on voit au microscope, nous engageons de parcourir les différents Mémoires du Dr Lang dans les *Mittheilungen aus d. Zoologichen station zu Neapel.*

Pour faire l'étude des différentes espèces de sangsues, on les disséquera sous un réactif convenable, tel que l'acide chromique; puis, on dilacérera sous le porte-objet les différents organes, tels que le système nerveux, les organes sexuels, testicules et ovaires, etc. Pour obtenir des coupes, on inclura dans la paraffine comme il est indiqué au tableau VII, exercice 1. On étudierait de même les clepsines, qui sont communes dans les eaux douces. On choisira l'un de ces animaux, ayant des dimensions telles qu'on puisse faire des coupes complètes dans une direction parallèle à la face ventrale; on les traitera comme nous l'avons indiqué pour le polystome de la vessie de la grenouille.

Annélides. — Dans les ruisseaux, on trouve plusieurs annélides dont quelques-uns peuvent être étudiés par transparence; tels sont les *Tubifex* et les *Naïs*. Ces derniers vers se reproduisent par bourgeonnement; ce phénomène, facile à observer, est très intéressant.

Pour l'étude histologique, on aura recours à la dilacéra-

tion et à la méthode des coupes, en employant la paraffine pour inclure.

Le lombric des jardins est un sujet qui mérite de fixer l'attention du commençant. On le disséquera sous l'acide chromique à $^3/_{1000}$ ou dans l'alcool à $^1/_3$; puis on étudiera, en ayant recours à la dilacération, le système nerveux, les organes segmentaires, les organes génitaux, etc; on colorera et on montera comme il est indiqué au tableau I. Nous avons déjà dit comment on doit étudier la formation des spermatozoïdes chez l'animal qui nous occupe.

Nous avons fait connaître, à la suite du tableau VII, exercice 1, comment on doit couper le lombric pour en étudier la texture.

Il est important de sectionner toute la partie antérieure d'un même sujet jusqu'aux organes génitaux. Pour le reste du corps, on choisira des fragments de distance en distance, de façon à se rendre compte de la structure de l'animal dans toute sa longueur.

MOLLUSQUES.

Lamellibranches. — On choisit une moule de 2 à 2 $^1/_2$ centimètres de longueur; on coupe la charnière et on incise les ligaments. On enlève une seule valve de la coquille, laissant l'animal reposer dans l'autre valve. On introduit ainsi dans l'acide chromique à $^3/_{1000}$ ou dans le liquide de Merkel. On laisse agir 24 heures. On passe par les différents alcools. Le durcissement obtenu, on colore par le picro-carmin. On achève les manipulations du tableau VII à partir de D inclusivement. — D*a*, D*b*, D*c*, de deux en deux

heures, D*d*, 6 heures; — E[1] *a*, *b*, *c*, *d*, de deux en deux heures; — F[1], 8 heures; — G, quatre heures. Les autres manipulations se font en suivant les indications du même tableau.

On obtiendra, en procédant comme nous venons de l'indiquer, de superbes coupes entières, sur lesquelles on étudiera toute l'anatomie des lamellibranches.

Un autre sujet, qui se prête encore mieux à l'étude, se rencontre dans les eaux douces. On trouve sur les plantes aquatiques et au fond des ruisseaux, de petits lamellibranches, les *Cyclas*, dont la coquille blanche et très mince mesure, au maximum, $^3/_4$ de centimètre chez les plus grands individus. On enlèvera encore l'une des valves sans blesser l'animal; on traitera par l'acide chromique à $^3/_{1000}$, 24 heures, ou par le liquide de Kleinenberg, 2 heures. On passera aux différents alcools. En deux jours, le durcissement sera complet. On colorera au picro-carmin et on suivra la marche du tableau VII, à partir de D inclusivement.

D*a*, D*b*, D*c*, d'heure en heure; — D*b*, 3 heures. — E[2]*a*, quelques heures. E[2]*b*, deux heures; — F[2], quatre heures.

On terminera comme le tableau l'indique. On procédera de façon à avoir la série complète des coupes. Cette série de coupes bien étudiée présente des choses très instructives et qui ne sont pas encore étudiées.

Gastéropodes. — Pour connaître la structure et la texture des gastéropodes, nous conseillons de traiter comme les cyclas, l'ancil, ce petit mollusque si commun dans les eaux douces. La coquille a la forme du bonnet phrygien, rappelant l'aspect de la patelle. On fera deux séries de coupes, l'une transversalement, l'autre longitudinalement. Pour soumettre

l'animal aux réactifs fixateurs, l'acide chromique ou le liquide de Merkel, on ne l'extrait pas de la coquille ; on ne procède à cette opération que lorsque le durcissement aura été obtenu par l'alcool et lorsqu'il s'agira de colorer.

On trouve dans les jardins de petites limaces grises de un à deux centimètres de longueur; on en choisira quelques-unes qu'on laissera s'étaler dans un petit vase en verre; puis, on y versera rapidement, et de façon à ce qu'il y ait le moins de contraction possible, du chlorure mercurique en solution saturée et bouillante. Quand les mollusques seront blanchis, ce qui arrive après quatre à cinq minutes, on les transportera dans l'alcool au $^1/_3$ additionné par 30 centimètres cubes de cinq gouttes d'acide chlorhydrique.

On passera ensuite aux différents alcools pour obtenir un durcissement complet. On colorera au picro-carmin et à l'éosine, formule de Lang, deux jours. Puis on continuera la marche du tableau VII.

D*a*, D*b*, D*c*, de deux en deux heures. — D*d*, six heures ;

E^1, *a*, *b*, *c*, *d*, de quatre en quatre heures ;

F^1, trois heures ; — G, trois heures. Achever successivement les manipulations qui suivent.

Faire deux séries de coupes : les unes transversales, les autres longitudinales et parallèles à la face ventrale.

Ces deux séries sont extrêmement instructives.

ARTHROPODES.

On étudiera, en les dilacérant d'abord, les petits crustacés d'eau douce, tels que le cyclope et le daphnis. On traitera ensuite ces animaux par l'acide osmique à $^1/_{1000}$, quelques

minutes; on les durcira par l'alcool (B*a*, B*b*, B*c*, B*d* du tableau VII, d'heure en heure). On colorera par le carmin borique. En D, on passera de quart en quart d'heure dans les différents alcools. E^2a, trente minutes, E*b*, trente minutes; F^2, quinze minutes; G, trente minutes. Achever suivant les indications du même tableau.

Les araignées seront étudiées par la méthode des coupes. On les traitera par le liquide de Kleinenberg, puis on suivra la marche du tableau VII, en mettant pour accomplir chaque réaction un temps en rapport avec le volume de l'animal.

Les insectes et leurs larves seront fixés par l'acide picro-chlorhydrique ou picro-nitrique de Mayer. La chitine est ramollie par ces réactifs, au point de pouvoir être facilement coupée au rasoir par la méthode à la paraffine. Pour colorer, on employera l'acide carminique en solution alcoolique ou le carmin borique alcoolique. On effectuera les manipulations du tableau VII, en laissant un espace de temps à chaque liquide pour réagir en rapport avec les dimensions de la pièce.

Disons, en passant, que les articulés méritent d'être étudiés avec soin; il y a là bien des choses à découvrir.

VERTÉBRÉS.

Nous avons indiqué, dès le début de ces exercices, comment on prépare les têtards de grenouille, de salamandre et de triton. Pour connaître la structure des vertébrés, nous engageons les débutants à se procurer des embryons de petits mammifères, souris et musaraignes, au moment où les embryons sont sur le point d'être mis bas. On les traitera

par le liquide de Müller, contenant par litre 3 gr. d'acide chromique.

On les inclura, comme il est indiqué pour le têtard de grenouille, en suivant les indications du tableau VII. On aura ainsi sous la main le matériel nécessaire, non seulement pour étudier la texture des mammifères, mais encore pour se faire une idée des organes et de leurs rapports.

Dans les abattoirs, on se procurera très facilement des embryons de brebis et de vache. Quand on obtiendra des spécimens très petits, on les soumettra aux manipulations que nous venons d'indiquer pour la souris. Sur des sujets plus volumineux, on aura à examiner les organes un à un en les soumettant à des préparations convenables.

MÉTHODE DES INJECTIONS.

En injectant dans les vaisseaux d'un animal une substance colorée, on parvient à mettre en relief les différents systèmes de canaux qui sillonnent un organe. Pour se faire une idée de la circulation dans certaines glandes compliquées telles que les reins, le foie, il n'est rien de plus démonstratif que l'examen de ces organes lorsqu'ils ont été convenablement injectés.

La méthode des injections présente des difficultés assez sérieuses.

Nous n'avons pas, pour cette raison, voulu développer cette matière d'une façon complète dans ce manuel. Nous renvoyons pour l'étude détaillée des injections aux excellents traités français dans lesquels ce sujet est si bien déve-

loppé : nous avons nommé le *Traité de Technique* du savant histologiste du Collège de France, et le *Traité du microscope* par l'illustre et regretté Robin.

Nous prendrons comme exercice l'injection des vaisseaux sanguins de la grenouille; chez cet animal, cette opération réussit bien en prenant quelques précautions.

Une seringue métallique de 5 à 10 c/c de capacité, munie de quelques canules de différents calibres, suffit comme instrument (1).

Les masses à injection qui ont été proposées sont nombreuses. Comme véhicule, c'est la gélatine qui est préférée; comme substance colorée pour l'exercice que nous proposons, on choisira le carmin.

MASSES D'INJECTION.

Formule de Robin. — *a*) 3 grammes de carmin sont pulvérisés dans un mortier; on humecte d'eau distillée; on ajoute une quantité d'ammoniaque suffisante pour dissoudre le carmin; on verse 50 grammes de carmin.

b) On additionne 50 grammes de glycérine de 5 grammes d'acide acétique, et on ajoute cette solution à la solution obtenue en *a* jusqu'à réaction acide. Le papier de tournesol indiquera cette réaction.

d) Une partie de la solution *b* est ajoutée à la masse véhiculaire, que l'on obtient en dissolvant à chaud 1 partie de gélatine dans 10 parties d'eau. La masse obtenue ainsi est passée à travers un linge; elle s'emploie en la chauffant au

(1) Lucr, Mathieu, constructeurs à Paris, fournissent tous les instruments de chirurgie nécessaires aux injections.

bain-marie vers 45° à 60°. La pièce à injecter doit être portée à la même température.

Formule de Hoyer (Biolog. Centrablatt, 1882). — Une partie d'une solution de gélatine dans l'eau est additionnée d'une partie du carmin de Hoyer (p. 204). On fait digérer au bain-marie. On ajoute 5 à 10 p. c. du volume de glycérine et 2 p. c. de chloral. On passe à travers un fragment de flanelle.

MANIPULATIONS.

Une grenouille sera placée dans de l'eau tiède, où elle ne tardera pas à succomber. On ouvrira l'animal, puis on coupera l'extrémité libre du cœur. On introduira dans le ventricule, puis dans le bulbe de l'aorte la canule de la seringue; on liera.

La seringue étant remplie par la masse à injection tenue liquide par une température convenable, on ajustera la canule et on poussera l'injection en maintenant la grenouille dans l'eau tiède.

Si l'on voulait injecter le système veineux, la canule serait introduite dans l'oreillette droite, puis dans le sinus veineux, et on procéderait comme on vient de le décrire.

Si l'injection a réussi, la peau de la grenouille sera teinte en rouge.

L'animal sera retiré de l'eau; après refroidissement, on détachera un fragment de la peau, le foie, les reins, la rate, le pancréas, etc. On plongera le tout dans l'alcool à 70 $^{1}/_{2}$ pendant quelques heures, puis on durcira à l'alcool à 90. On inclura dans la paraffine, dans la celloïdine ou

une autre substance, comme il a été indiqué antérieurement.

Quand on aura acquis l'expérience suffisante en pratiquant l'exercice que nous venons de décrire, on injectera d'autres animaux.

Pour la conservation des tissus, il est quelquefois utile de faire pénétrer les liquides fixateurs, tels que l'acide chromique. Ces injections présentent moins de difficultés. Comme canule, on peut alors choisir un tube de verre étiré que l'on introduit dans les vaisseaux. L'autre extrémité du tube de verre est reliée à un tube de caoutchouc que l'on maintient élevé à la hauteur de 50 à 60 c/m. Un entonnoir y est adapté; il est destiné à contenir le liquide à injecter. Par la pression de la colonne liquide, l'injection est poussée dans les vaisseaux.

IV

APPENDICE AUX EXERCICES MICROGRAPHIQUES.

La plupart des méthodes de fixation, de coloration et d'inclusion que nous avons décrites, sont applicables à l'histologie végétale. Cependant, il était de notre intention de ne point nous occuper ici de botanique; mais sur les conseils de plusieurs personnes, nous nous sommes décidé à indiquer quelques exercices concernant la texture des végétaux.

ANTHÈRE ET OVAIRE.

Un anthère d'iris, au moment où la fleur va s'épanouir, est traité par l'alcool absolu qu'on laisse réagir 24 heures.

On colore par l'acide carminique alcoolique (70 p. c. d'alcool), par la cochenille de Mayer ou le picro-carmin. On repassera par les différents alcools, puis on suivra la marche du tableau VII, à partir de E^1 : E^1a, 2 heures ; E^1a, 2 heures ; E^1b, 2 heures ; E^1c, 2 heures ; E^1d, 4 heures ; F^1, 4 heures ; G, 4 heures. La suite des opérations se fera comme l'indique le tableau.

Pour étudier la formation des grains de pollen, on enlèvera l'anthère dans le bouton bien avant l'épanouissement de la fleur, et l'on procédera comme nous venons de l'indiquer.

On traitera l'ovaire de jacinthe de la même façon. Pour voir le boyau pollinique parcourir le style dans toute sa longueur, on choisira de petites crucifères à silicules ; on coupera longitudinalement et bien parallèlement à l'axe du style. On procédera comme nous venons de l'indiquer, en ayant soin de recourir à la méthode de sériation des coupes.

TIGES ET FEUILLES.

Les tiges herbacées sont traitées par l'alcool absolu ; elles sont colorées par le carmin aluné et enrobées dans le savon (tableau IV). La celloïdine ou la gomme, suivant les circonstances, donnent de bons résultats. Cependant, c'est le savon qui nous a donné les meilleures préparations.

Les feuilles, dans la plupart des cas, seront coupées dans la moelle de sureau et la gomme. Le savon réussit également très bien. On traite un fragment de feuille par l'alcool absolu ; on colore par le carmin picrique ou borique. On replace dans l'alcool à 90° et on inclut dans le savon comme il est indiqué au tableau IV.

Les tiges herbacées, les feuilles et autres organes analogues ne peuvent être enrobés dans la paraffine sans subir des altérations dues à l'action dissolvante de la térébenthine et du chloroforme.

CHAMPIGNONS.

Les petits champignons hyménomycètes, dont le diamètre ne dépasse pas 1 centimètre, sont inclus dans la paraffine. On traite d'abord par l'alcool $^1/_3$, à 70°, à 90° et à 100°; on colore par le picro-carmin, qui produit des doubles colorations caractéristiques. On achève les manipulations du tableau VII. Les coupes longitudinales, comprenant en même temps le stipe et le chapeau, sont très instructives. Les coupes transversales du chapeau ne le sont pas moins.

La *Peziza aurantiaca* est un sujet qui se prête encore très bien à l'étude. On traite par l'alcool absolu, on colore au picro-carmin, qui donne des doubles colorations très belles; on inclut dans la paraffine, en suivant la marche du tableau VII. Tous les grands champignons peuvent être traités de même.

Pour la préparation d'objets sur la lame, on aura souvent recours au tableau I, en variant les réactifs fixateurs suivant les circonstances.

Ces quelques exercices suffisent pour faire acquérir la pratique des méthodes que nous avons décrites, quand il s'agira de l'histologie végétale.

V

QUELQUES CONSEILS RELATIFS AUX TRAVAUX ORIGINAUX.

Le micrographe qui voudrait aborder l'étude d'une question neuve sur des matériaux qu'il croirait devoir fournir des choses non décrites, devra d'abord se livrer à des recherches bibliographiques. La connaissance des principales revues et journaux scientifiques dans lesquels les travaux originaux se publient est nécessaire. Les traités de zoologie et d'anatomie comparée donnent, d'une façon assez complète, la bibliographie générale concernant les grandes divisions du règne animal. Il en est ainsi du moins pour *le Traité de Zoologie*, de Claus, et *le Manuel d'Anatomie comparée*, de Gegenbaur. Avec les premiers renseignements sur cette matière, donnés par les deux ouvrages que nous venons de citer, il ne sera pas difficile de faire la bibliographie complète concernant un sujet.

Ensuite, parmi les mémoires qui traitent de la question que l'on veut aborder, on choisira le travail le plus récemment écrit par un auteur de quelque renom. Ce travail sera étudié non seulement par des lectures, mais encore en reproduisant, dans la mesure du possible, les préparations et manipulations pratiques qui font la base du mémoire. On procédera en quelque sorte à un travail de contrôle, non pas tant pour vérifier ce qui est avancé par l'auteur, mais bien afin d'acquérir l'habileté nécessaire pour entreprendre la question que l'on veut étudier. On dessinera les préparations obtenues en les observant au microscope et en se guidant sur les planches publiées par l'auteur.

On s'habituera ainsi à produire des dessins convenables quand il s'agira de dessiner les préparations concernant le sujet que l'on désire traiter.

Les dessins sont ombrés à l'estompe. Quand il s'agit d'indiquer des ombres sur de très petites surfaces, on se sert d'un fragment de moelle de sureau que l'on taille en pointe fine; celle-ci est enduite de graphite pris sur un crayon très noir. Pour les traits très fins, on lime la pointe du crayon, et on l'amincit encore sur une feuille de papier à l'émeri très menu. On peut également employer pour le dessin l'encre de Chine. Les différentes teintes pour faire ressortir les ombres s'obtiennent en appliquant des couches plus ou moins nombreuses d'encre de Chine. Les traits fins se tracent alors avec la plume à dessiner.

Les préparations et les dessins terminés, on rédigera le travail en se guidant encore, dans le principe, sur ce qui a été fait par des auteurs qui ont traité des sujets semblables à celui que l'on étudie.

Dans les débuts, on se gardera de tirer des conclusions hypothétiques.

En se plaçant purement au point de vue objectif, en décrivant avec soin ce que l'on voit sans se lancer dans des théories subjectives plus ou moins hardies, le débutant acquerra cette précision si nécessaire dans les recherches scientifiques.

APPENDICE.

DÉCOUVERTE DE VERRES OPTIQUES NOUVEAUX ET CONSTRUCTION D'OBJECTIFS PERFECTIONNÉS.

Le Dr Schott et le professeur Abbe, avec l'appui de la maison Zeiss, après cinq années d'un travail opiniâtre, viennent de découvrir des verres optiques nouveaux dont voici les principaux avantages :

1° Ces verres présentent des variétés beaucoup plus grandes dans le rapport entre la capacité de réfraction et de dispersion; par exemple, des verres d'une faible dispersion — crown glass — ont l'indice de réfraction du flint-glass;

2° Ces verres donnent des paires de crown et de flint chez lesquels la dispersion dans les différentes parties du spectre est presque complètement proportionnelle.

L'emploi des nouveaux verres pour la construction des objectifs permet une concentration de lumière plus parfaite qu'il était possible d'atteindre autrefois. Les images sont exemptes des aberrations chromatique et sphérique; elles sont donc ainsi plus nettes et plus pures, même quand on emploie des oculaires très forts.

Zeiss construit deux objectifs à immersion homogène en

employant les nouveaux verres; les distances focales sont, pour le premier, 3.00 m/m et 2.00 m/m. Les ouvertures numériques sont 1.40 et 1.30. Dans ce dernier cas, il s'agit de lentilles qui doivent servir à des recherches qui demandent de grandes distances frontales.

Pour l'immersion à l'eau, un objectif a été fabriqué avec une distance focale de 2.5 m/m et avec une ouverture numérique de 1.25. La monture est à correction.

Les objectifs à sec réalisés sont :

1°	Ouverture num.,	0.95;	distance focale,	4.0 m/m (monture à corr.).
2°	»	0 60	»	8.0 m/m
3°	»	0.30	»	16.0 m/m

Ces objectifs se fabriquent pour le tube anglais comme pour le tube continental.

Des oculaires, construits avec les verres de Schott et Abbe, ont également été montés. Ils permettent d'atteindre de fortes amplifications avec des objectifs à distances focales faibles sans nuire aux qualités optiques des images.

FIN.

BIBLIOGRAPHIE.

Journal de Micrographie, revue mensuelle des travaux français et étrangers. — Histologie humaine et comparée, anatomie végétale, botanique, zoologie, applications diverses du microscope, optique spéciale.

Ce journal, publié par l'histologiste bien connu, le Dr Pelletan, a contribué pour une immense part à la diffusion, en France comme en Belgique, des idées modernes relatives soit à la biologie, soit aux théories optiques nouvelles.

Balbiani, Duval, Fol, Abbe ont collaboré à cette publication ; c'est dire que ce ne sera pas sans utilité que cette revue sera consultée. Enfin, le Dr Pelletan s'efforce de tenir au courant ses nombreux lecteurs de toutes les découvertes qui se font dans l'art du micrographe.

Tous les laboratoires dans lesquels on fait usage du microscope devraient posséder une bibliothèque spéciale de *revues périodiques* qui tiennent le lecteur au courant des progrès de la technique. Les travailleurs connaîtraient ainsi tous les perfectionnements qui se réalisent dans les moyens de recherches.

Le journal du Dr Pelletan occuperait, à notre avis, la première place dans cette bibliothèque.

Journal of de Royal Microscopical Society (1), dont le principal rédacteur est Franck Crisp, enregistre avec un soin extrême toutes les inventions, tous les perfectionnements, toutes les découvertes qui intéressent le micrographe. La collection de cette revue périodique constitue des annales bien précieuses dans lesquelles on trouvera, soit complètement développées, soit suffisamment résumées, toutes les questions si intéressantes de l'optique microscopique. La plupart des travaux originaux d'Abbe ont paru dans cette publication.

En parcourant les cinq derniers volumes, on se fera une idée précise des progrès qui se sont accomplis dans la technique microscopique dans ces dernières années.

Ce journal résume également les travaux d'histologie et d'anatomie comparée qui se publient dans tous les pays. Il paraît tous les deux mois. La publication dont nous nous occupons rend d'immenses services; comme le journal du D[r] Pelletan, nous voudrions la voir figurer dans la *Bibliothèque usuelle* dont il a été question plus haut.

Les travailleurs qui veulent se tenir au courant des procédés nouveaux et du perfectionnement des appareils, ne manqueront pas de lire régulièrement ce journal.

Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie und für Mikroskopische Technik. — Cette revue a pour directeur le savant micrographe Jul. Behrens. La première livraison a paru en janvier 1884. Depuis, ce journal a donné un grand nombre d'articles de la plus haute importance sur la technique de la coloration et de l'inclusion. Des travaux d'op-

(1) Abréviations J. R. M. S.

tique microscopique intéressants y ont pris également une large place.

Plusieurs instruments nouveaux ou perfectionnés y ont été décrits pour la première fois. Ce journal donne un compte rendu des travaux concernant l'optique microscopique; les travaux qui ont trait à la biologie y sont également très bien résumés. Ce journal sera régulièrement consulté par les micrographes jaloux de se tenir au courant des progrès de la technique. Cette publication devra figurer dans la bibliothèque des périodiques dont nous avons parlé.

Zoologischer Anzeiger. Cette publication a pour directeur, le professeur Victor Carus, à Leipzig. Les travailleurs qui réalisent des perfectionnements dans la technique et qui désirent faire part rapidement de leur trouvaille, font enregistrer leur découverte dans cette excellente revue. Il en est de même pour ce qui concerne les branches biologiques. Cette publication sera consultée chaque fois qu'elle paraîtra. Elle fera partie de la bibliothèque des périodiques du laboratoire.

Biologisches centralblatt. Cette revue a pour directeur, le D[r] Selenka. Cette publication est analogue à la précédente.

Mittheilungen aus der zoologischen Station zu Neapel. On trouvera dans cette publication, outre des mémoires originaux écrits à la célèbre Station zoologique de Naples, un grand nombre de renseignements concernant la technique microscopique. Les biologistes les plus célèbres du monde entier se sont donné rendez-vous au laboratoire de M. Dorhn. On ne s'étonnera donc pas si cette Station a tant contribué au progrès des moyens employés dans les recherches biologiques.

Archiv für mikroskopische Anatomie. Ce journal a pour directeurs Lavalette Saint-George et Waldeyer; on y trou-

vera un grand nombre de renseignements concernant la technique microscopique.

On lira également les revues françaises que nous allons énumérer.

1. *Comptes rendus.*

2. *Travaux du laboratoire d'histologie du Collège de France.*

3. *Archives de Physiologie.*

4. *Archives de Zoologie expérimentale et générale.*

5. *Bulletin de la Société zoologique de France.*

6. *Bulletin scientifique du département du Nord.*

7. *Bulletin d'histoire naturelle de Toulouse.*

Le *Bulletin de la Société de Microscopie de Belgique* renferme un grand nombre de renseignements concernant la technique.

Les *Archives de Biologie*, publiées par Ed. Van Beneden et C. Van Bambeke, contiennent dans leurs derniers fascicules des renseignements concernant la technique dus au Dr Fœttinger.

Les trois journaux américains dont les noms suivent se sont aussi occupés, dans ces derniers temps, des perfectionnements des méthodes en usage en microscopie.

1. *American Journal of Microscopy.*

2. *American Monthly microscopical Journal.*

3. *American Naturalist.*

PRINCIPAUX TRAITÉS QUE L'ÉLÈVE MICROGRAPHE LIRA AVEC FRUIT :

1. *Traité de Technique d'histologie*, par Ranvier.

2. *Traité du Microscope*, par Ch. Robin.

3. *Le Microscope, sa construction, son maniement et son application à l'anatomie végétale et aux diatomées*, par Van Heurck.

4. *L'Étudiant micrographe*, par Chevalier.

5. *Manuel d'Histologie*, par le Dr J. Pelletan.

6. *Manuel de Technique microscopique*, par P. Latteux.

7. *Étude sur les Microscopes étrangers*, et *le Microscope, son emploi et ses applications*, par le Dr Pelletan.

8. *Histoire sommaire du Microscope composé*, par Peragallo.

9. *Le Microscope et son application spéciale à l'étude de l'anatomie végétale*, par Hermann Schacht.

10. *Traité élémentaire du Microscope*, par Trutat.

11. *La Biologie cellulaire*, par J.-B. Carnoy. (Ouvrage important.)

12. *The Microscope*, par Jabez Hogg.

13. *Microscopical Section-Cutting*, par Marsh.

14. *Das Mikroskop*, par Nägeli et Schwendener.

15. *Mikroskopische Technik*, par Friedländer.

16. *Hilfsbuch zur Ausführung Mikroskopicher Untersuchungen*, par Behrens.

17. *Das Mikroskop und seine Anwendung*, par Dippel.

18. *Programme du Cours d'histologie* professé à l'Université de Bruxelles, par Rommelaere.

19. *Manuel de Microscopie clinique*, par Bizzozero et Firket. La 3e édition de cet excellent ouvrage est actuellement sous presse.

20. *Manuale per la Tecnica moderna del microscopio*, par le Dr Adriano Garbini.

21. *The Microscope and its Revelations*, par Carpenter.

22. *The Microscrope and its Application to Clinical Medicine*, par L. Beale.

23. *Das Mikroskop und die Mikroskop. Technick*, par Frey.

24. *Traité d'Histologie et d'Histochimie*, par Frey. Traduit par Spillman.

25. *Microchimie végétale*, par Poulsen.

26. *Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie*, par Hermann Fol.

TABLE ALPHABÉTIQUE

DES NOMS CITÉS.

TABLE DES MATIÈRES.

PAGES.

PREMIÈRE PARTIE.

I

DISSECTIONS.

II

MICROSCOPE SIMPLE OU A DISSECTION.

III

MICROSCOPE COMPOSÉ.

IV

DESCRIPTION D'INSTRUMENTS.

DEUXIÈME PARTIE.

TECHNIQUE PROPREMENT DITE.

I

RÉACTIFS FIXATEURS ET DURCISSANTS.

II

RÉACTIFS COLORANTS.

III

RÉACTIFS DIVERS.

IV

FERMETURE DES PRÉPARATIONS.

V

USTENSILES NÉCESSAIRES AUX COMMENÇANTS

VI

MÉTHODES EMPLOYÉES DANS LES RECHERCHES D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE.

TROISIÈME PARTIE.

EXERCICES.

I

EXERCICES HISTOLOGIQUES.

II

EXERCICES D'EMBRYOLOGIE.

III

EXERCICES DE ZOOLOGIE ET D'ANATOMIE COMPARÉE.

FIN DE LA TABLE DES MATIÈRES.



